

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MARLISE INÊZ KLEIN
Cirurgiã Dentista

Transmissão, diversidade e estabilidade de genótipos de
***Streptococcus mutans* e de *Streptococcus sobrinus*:**
estudo longitudinal em crianças

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Buco-Dental, área de Concentração em Microbiologia e Imunologia.

PIRACICABA
2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MARLISE INÊZ KLEIN
Cirurgiã Dentista

Transmissão, diversidade e estabilidade de genótipos de
Streptococcus mutans e *Streptococcus sobrinus*:
estudo longitudinal em crianças

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Buco-Dental, área de Concentração em Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Francisco Höfling

Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Profa. Dra. Renata O. Mattos-Graner

PIRACICABA

2003

Ficha Catalográfica

K672t Klein, Marlise Inêz.
Transmissão, diversidade e estabilidade de genótipos de *Streptococcus mutans* e de *Streptococcus sobrinus*: estudo longitudinal em crianças. / Marlise Inês Klein. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
xiii, 139p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Streptococcus mutans. 2. Genótipo. 3. Diversidade. 4. Estabilidade. I. Gonçalves, Reginaldo Bruno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

Dedicatória

À Deus, pela presença e vigília constantes.

*Aos meus pais, Álvaro e Lourdes, pelo imenso carinho e amor recebidos durante minha vida.
Estiveram comigo incentivando-me em todos os momentos. Ensinaram-me a ter responsabilidade,
tolerância e honestidade, valores que considero essenciais para seguir cada passo de minha vida.*

*Aos meus irmãos, Denise, Marcia, Ricardo e Cristiane,
pelo carinho e incentivo. Cada um, a seu modo, me ajudou a crescer.*

Aos meus sobrinhos, Everton e Wesley, pela alegria das novas descobertas.

*Ao Alex, por cada momento que passamos juntos,
pelo carinho, amizade, incentivo e companheirismo dedicados.*

Com carinho,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves**, pela confiança e oportunidades oferecidas. Agradeço ainda pelo incentivo dado, pela inestimável orientação e contribuição à minha formação profissional.

Ao Professor da Área de Microbiologia e Imunologia **Prof. Dr. José Francisco Höfling**, pela amizade, respeito e contribuição preciosa à minha formação.

Ao **Prof. Dr. Celso P. da Costa** (*in memoriam*), pela amizade e incentivo a buscar novos conhecimentos a cada novo dia. A admiração que tenho por você, motiva-me a seguir o caminho escolhido.

Aos meus grandes amigos da Graduação **Ademar Takahama Júnior, Carlos H. Bittencourt, Dawton A. Pulhez, Érico B. N. S. Campos, Laura M. Tomita, Leonardo G. Cunha, Livia L. Gushi, Marcelo S. Yaschiro, Mariana T. P. Nogueira, Neimar B. Nastaro, Paula M. Castelo, Roberta C. B. Alonso e Vanessa T. Kobaiashi**, por dividirem comigo as conquistas e dificuldades durante nossa caminhada.

Às minhas grandes amigas da Pós-Graduação **Ana Cláudia B. Amoras Alves, Flávia M. Flório, Regianne U. Kamiya, Rita de Cássia Mardegan e Rosimeire T. Rosa**, pela amizade sincera e cumplicidade. A nossa convivência me proporcionou momentos de muita alegria e amadurecimento pessoal.

Aos meus colegas de laboratório, **Daniel Saito, Iriana C. J. Zanin, Janaína A. O. Rodrigues, Letizia M. Barros, Magda E. B. Gouvêa, Marcelo H. Napimoga, Marcelo F. G. Boriollo, Marcelle M. Nascimento, Rafael N. Stipp, Thais Emídio, Wagner L. C. Bernardo**, pelo convívio.

Aos amigos e funcionários da Área de Microbiologia e Imunologia, **Wilma Ferraz** e **Anderson L. Teixeira**, pela amizade, colaboração e disposição durante nossa convivência.

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz** e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por meio do Diretor **Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho**.

Ao **Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho**, coordenador dos cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

À **Profa. Dra. Silvana Pereira Barros**, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

À instituição de fomento **CAPES**, pelo apoio financeiro instituído pela concessão de bolsa.

Ao Departamento de Morfologia, Área de Histologia, na pessoa do **Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line**, pela colaboração e disponibilidade em permitir o uso do Laboratório e de Equipamento de Fotodocumentação para desenvolvimento experimental de parte deste trabalho.

Aos voluntários desse trabalho de tese.

À todos os amigos, colegas e pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| Listas..... | 01 |
| Listas de tabelas..... | 01 |
| Lista de figuras | 03 |
| Lista de abreviaturas, siglas e palavras em outro idioma | 05 |
| Resumo | 09 |
| Abstract | 11 |
| 1. Introdução | 13 |
| 2. Revisão de Literatura | 15 |
| 2.1. Estreptococos grupo mutans e cárie dental | 15 |
| 2.2. Aquisição e colonização de estreptococos grupo mutans | 18 |
| 2.3. Transmissibilidade de estreptococos grupo mutans | 21 |
| 2.4. Diversidade de genótipos de <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> em crianças | 32 |
| 2.5. Estabilidade de genótipos bacterianos na infância | 36 |
| 2.6. Métodos para análise genotípica | 40 |
| 3. Proposição | 45 |
| 4. Metodologia | 47 |
| 5. Resultados | 59 |
| 6. Discussão | 81 |
| 7. Conclusão | 95 |
| Referências Bibliográficas..... | 97 |
| Anexos..... | 115 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| TABELA 1: | <i>Primers</i> utilizados para identificação de <i>S. mutans</i> e de <i>S. sobrinus</i> pela técnica de PCR. | 54 |
| TABELA 2: | Identificação dos isolados bacterianos provenientes da cavidade bucal de 16 pares mãe-filho submetidos a rastreamento epidemiológico longitudinal. | 59 |
| TABELA 3: | Distribuição e número de genótipos de <i>S. mutans</i> isolados da cavidade bucal das mães e de seus respectivos filhos (no momento da aquisição inicial - primeira colheita positiva para <i>S. mutans</i> na criança; e após a aquisição inicial – adquiridos durante o acompanhamento) nos 16 pares mãe-filho submetidos ao presente rastreamento epidemiológico longitudinal: subgrupos com e sem transmissão maternal. | 62 |
| TABELA 4: | Distribuição e número de genótipos de <i>S. sobrinus</i> isolados da cavidade bucal das mães e de seus respectivos filhos (no momento da aquisição inicial - primeira colheita positiva para <i>S. sobrinus</i> na criança; e após a aquisição inicial – adquiridos durante o acompanhamento) nos 16 pares mãe-filho submetidos ao presente rastreamento epidemiológico longitudinal: subgrupos com e sem transmissão maternal. | 63 |
| TABELA 5: | Ocorrência de transmissão vertical de <i>S. mutans</i> nos 16 pares mãe-filho durante o acompanhamento. | 64 |
| TABELA 6: | Ocorrência de transmissão vertical de <i>S. sobrinus</i> nos 16 pares mãe-filho submetidos ao presente rastreamento epidemiológico longitudinal. | 65 |

| | | |
|------------|---|----|
| TABELA 7: | Total de isolados e de genótipos de <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> detectados nas crianças e nas mães. | 71 |
| TABELA 8: | Diversidade genotípica <i>S. mutans</i> x sítios de coleta x número de isolados nas 16 crianças estudadas. | 72 |
| TABELA 9: | Diversidade genotípica <i>S. sobrinus</i> x sítios de coleta x número de isolados em 12 das 16 crianças estudadas. | 73 |
| TABELA 10: | Estabilidade de genótipos de <i>S. mutans</i> detectados nas 16 crianças envolvidas no rastreamento epidemiológico longitudinal, divididas em 3 subgrupos: estabilidade efetiva, estabilidade transitória e sem estabilidade. | 77 |
| TABELA 11: | Diversidade de genótipos <i>S. mutans</i> com estabilidade efetiva x sítios de coleta x número de isolados em 7 das 16 crianças estudadas. | 78 |
| TABELA 12: | Estabilidade de genótipos de <i>S. sobrinus</i> detectados no subgrupo de 12 em que <i>S. sobrinus</i> foram detectados durante o estudo, dividido em 2 subgrupos: estabilidade transitória e sem estabilidade. | 80 |

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Gel de agarose com resultados de identificação. Linhas 1 e 12: padrão de 60
peso molecular de 100 pb, Linhas 2 e 13: Controles positivos, Linhas 3 e
14: Controles negativos, Linhas 4 a 7, 9 a 11: amostras de isolados de *S.*
mutans, Linhas 15 a 17, 19 e 22: amostras de isolados de *S. sobrinus*.
- FIGURA 2: Perfis eletroforéticos de *S. mutans* isolados da cavidade bucal do par mãe- 61
filho 8, obtidos pela técnica de AP-PCR utilizando *primers* OPA-02
(Linhas 2 a 12) e OPA-13 (Linhas 13 a 22). Linha 1: padrão de peso
molecular de 100 pb; Linha 2: *S. mutans* CCT 3440; Linhas 3 a 22 isolados
de *S. mutans*.
- FIGURA 3: Gráfico da ocorrência de transmissão vertical de *S. mutans*, *S. sobrinus*, e 66
ambos *S. mutans* e *S. sobrinus*.
- FIGURA 4: Dendograma representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* 68
detectados nas crianças 4 e 5, que compartilhavam o mesmo ambiente na
creche municipal.
- FIGURA 5: Dendograma representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* 68
detectados, durante o acompanhamento longitudinal, nas crianças 2, 3 e 7,
que compartilhavam o mesmo ambiente na creche municipal.
- FIGURA 6: Dendograma representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* 69
detectados nas crianças 12 e 13, que compartilhavam o mesmo ambiente
na creche municipal.

FIGURA 7: Dendograma representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* 69 detectados nas crianças 24, 28 e 32, que compartilhavam o mesmo ambiente na creche municipal.

FIGURA 8: Gráfico do número de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* detectados na 75 placa dental em função do número de dentes presentes nas crianças.

FIGURA 9: Gráfico do número de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* detectados em 76 função da idade das crianças.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E PALAVRAS EM OUTRO IDIOMA

| | |
|-----------------------------------|---|
| <i>Amplicons</i> | Produto resultante de amplificação por PCR. |
| AP- PCR | Sigla em inglês de Reação em Cadeia da Polimerase com <i>primer</i> arbitrário (<i>arbitrarily primed PCR</i>). |
| ATCC | American Type Culture Collection. |
| BHI | Brain Hearth Infusion (infusão de cérebro e coração). |
| ceo-d | Dentes decíduos cariados, extraídos ou obturados. |
| <i>Checkerboard DNA probe</i> | Técnica que utiliza sondas de DNA. |
| cm | Centímetros. |
| CPOD | Dentes permanentes cariados, perdidos ou obturados. |
| DNA <i>fingerprint</i> | “Impressão digital” do DNA. |
| dNTP | Trifosfatos de desoxirribonucleotídeos. |
| <i>et al.</i> | E outros (abreviatura de “ <i>et alli</i> ”). |
| EMEIS | Escolas Municipais de Educação Infantil. |
| g | Gramas. |
| L | Litro. |
| min | Minuto. |
| mL | Mililitro. |
| mM | Milimolar. |
| MSB | <i>água mitis salivarius</i> acrescido de bacitracina. |
| n | Número. |
| °C | Grau Celsius. |

| | |
|------------------|--|
| OMS | Organização Mundial da Saúde. |
| p | Nível de significância estatística. |
| pb | Pares de base. |
| pCO ₂ | Pressão parcial de dióxido de carbono. |
| PCR | Sigla em inglês de Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>). |
| PFGE | Sigla em inglês de Eletroforese de Campo Pulsado (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>). |
| pH | Potencial hidrogeniônico. |
| <i>Primers</i> | Oligonucleotídeo que inicia uma reação de polimerização a partir de sua hibridização com a cadeia molde à qual é complementar. |
| r.p.m. | Rotações por minuto. |
| REA | Sigla em inglês de análise por enzima de restrição (<i>Restriction Enzyme Analysis</i>). |
| Rf | Mobilidade relativa. |
| RFLP | Sigla em inglês de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>). |
| seg | Segundo. |
| <i>Swab</i> | Dispositivo esterilizado utilizado para realização de coletas. |
| <i>Taq</i> | DNA polimerase isolada de <i>Termus aquaticus</i> . |
| U | Unidade(s). |
| U/L | Unidades por litro. |
| UFC | Unidades formadoras de colônia. |

| | |
|-------|--|
| UPGMA | Alogarítmo de agrupamento (<i>unweight pair-group method with mathematic average</i>). |
| µg/mL | Microgramas por mililitro. |
| % | Porcentagem. |
| & | E. |
| ng | Nanogramas. |
| µL | Microlitros. |
| nm | Nanômetros. |
| µM | Micromolar. |
| < | Menor que. |
| > | Maior que. |

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar, a partir do momento da colonização inicial da cavidade bucal de crianças por *S. mutans* e *S. sobrinus*, a diversidade e a estabilidade de genótipos destas espécies, assim como investigar a ocorrência de transmissão vertical de mãe para filho e/ou horizontal entre crianças que compartilham o mesmo ambiente. Os voluntários foram 16 pares mãe-filho, onde as crianças foram acompanhadas por 19,2 meses em média (menor e maior período de acompanhamento, foram, respectivamente 14,8 e 24,7 meses). Amostras foram coletadas bimestralmente de quatro sítios distintos: saliva, dorso da língua, rodete gengival e placa bacteriana (quando da presença de dentes). Amostras de saliva das mães foram coletada em uma única ocasião. As amostras foram cultivadas sob condições adequadas em meio de cultura MSB (*mitis salivarius bacitracina*). Em cada colheita foram isoladas colônias com morfologia típica, as quais foram identificadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). O perfil genético dos isolados identificados como *S. mutans* e *S. sobrinus* foi analisado pela técnica de reação em cadeia da polimerase usando *primers* arbitrários (AP-PCR), utilizando-se os *primers* arbitrários OPA-02 e OPA-13. Os resultados mostraram que no momento da aquisição, as crianças avaliadas estavam colonizadas por 1 a 4 genótipos distintos de *S. mutans* (n=16 crianças) e apenas 1 genótipo de *S. sobrinus* (n=12 crianças). Ocorreu transmissão vertical de *S. mutans* e de *S. sobrinus* em 13 e 5 dos 16 pares avaliados, respectivamente. Entretanto, não se detectou ocorrência de transmissão horizontal entre as crianças que compartilhavam o mesmo ambiente. Na avaliação longitudinal observou-se um aumento do número de genótipos que colonizavam a cavidade bucal das crianças, sendo que alguns genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* permaneceram estáveis e outros, idênticos ou não aos da mãe, foram adquiridos. Conclui-se que ocorreu estabilidade e também rotatividade de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* na cavidade bucal de crianças durante o período avaliado; e que a principal fonte das espécies avaliadas foi a maternal, porém, rotas de transmissão alternativas parecem existir.

ABSTRACT

The aims of this study were to evaluate the genotypic diversity and stability of *S. mutans* and *S. sobrinus* strains isolated from children oral cavity at time of initial acquisition; and analyze the pattern of vertical transmission of these bacteria from mother to their child among children attending public nursery schools. The subjects were mother-child pairs, and the children were monitored through 19.2 mean months (the smaller and the higher follow-up examination time were 14.8 and 24.7 months, respectively). Samples of four different sites (saliva, tongue dorsum, gingiva, and dental plaque, if teeth were present) were collected bimonthly. Saliva samples from the mothers were collected once. The samples were isolated and cultivated in MSB medium (*agar mitis salivarius* with *bacitracina*). Typical morphotype colonies were isolated and submitted to amplification by the technique of polymerase chain reaction (PCR) for identification. The arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) method was performed with two arbitrary primers, OPA-02 and OPA-13, for the genotypic characterization of *S. mutans* and *S. sobrinus*. At the time of acquisition, the children harbored between 1 to 4 distinct genotypes of *S. mutans* (n=16 children) and only 1 genotype of *S. sobrinus* (n=12 children). The presence of matching genotypes of *S. mutans* and *S. sobrinus* in 13 and 5 from 16 mother-child pairs, respectively, suggested vertical transmission. No horizontal transmission has observed since no matching of *S. mutans* and/or *S. sobrinus* genotypes was observed between children attending the same nursery. This longitudinal study showed an increase in genotypic diversity in the oral cavity of children *S. mutans* and *S. sobrinus* genotypes, that were or not similar to the mothers have persisted during follow-up and newly strains were also acquired. In conclusion, *S. mutans* and *S. sobrinus* stability and turnover occur in children oral cavity during this study; and the major source of this microorganism was maternal, however alternative transmission sources may exist.

1. INTRODUÇÃO

Streptococcus mutans e *Streptococcus sobrinus* são as espécies bacterianas mais comumente relacionadas à iniciação e progressão da cárie dentária (HAMADA & SLADE, 1980; LOESCHE, 1986). Conhecimentos sobre aquisição, colonização, estabilidade e a identificação das rotas de transmissão dessas espécies podem ser essenciais no planejamento de medidas preventivas da cárie.

Estudos de tipagem fenotípica e/ou genotípica têm mostrado que as cepas de *S. mutans* e *S. sobrinus* transmitidas às crianças podem ser provenientes principalmente da mãe, ou de outros indivíduos que mantenham contato com a criança durante as atividades e hábitos diários, ou mesmo provir do ambiente em que a criança vive (LI & CAUFIELD, 1995; van LOVEREN *et al.*, 2000; REDMO EMANUELSSON & THORQVIST, 2000; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b; KLEIN *et al.*, 2002). Várias espécies bacterianas que são transmitidas colonizam a cavidade bucal transitoriamente, entretanto, se encontrarem uma superfície favorável para sua aderência podem ter a sua colonização efetivada (SOCRANSKY & MANGANIELLO, 1971).

Estudos sobre a diversidade genotípica de isolados de estreptococos grupo mutans relatam diferentes números de genótipos detectados, variando de 1 a 5 genótipos diferentes por criança (KULKARNI *et al.*, 1989; CAUFIELD & WALKER, 1989; ALALUUSUA *et al.*, 1996; KREULEN *et al.*, 1997; GRONRROS *et al.*, 1998; REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998; KOZAI *et al.*, 1999; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b; KLEIN *et al.*, 2002).

Entretanto, entre os diversos estudos não há uma homogeneidade em relação ao período de acompanhamento da colonização por esses microrganismos e, não existe também uma concordância entre o número de genótipos encontrados em relação à idade da

criança das crianças avaliadas. A existência de grande diversidade genotípica nas espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* pode resultar na colonização da cavidade bucal por cepas com diferentes características de virulência (KÖHLER & KRASSE, 1990), assim como diferentes origens (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b; KLEIN *et al.*, 2002).

A estabilidade genotípica seria a permanência de determinado genótipo colonizando um nicho específico, no caso a cavidade bucal, por um determinado período de tempo. Contudo, existem poucos relatos na literatura a respeito de estabilidade de genótipos de estreptococos grupo mutans (CAUFIELD & WALKER, 1989; ALALUUSUA *et al.*, 1994; REDMO EMANUELSON & THORNQVIST, 2000, KLEIN *et al.*, 2002). Tem sido sugerido que as cepas que colonizam a cavidade bucal podem se manter estáveis por diversos anos, embora alguns genótipos detectados inicialmente podem não ser novamente isolados anos mais tarde (CAUFIELD & WALKER, 1989; ALALUUSUA *et al.*, 1994; REDMO EMANUELSON & THORNQVIST, 2000). Um dado importante a ser investigado seria se genótipos de estreptococos grupo mutans transmitidos pelas mães a seus filhos permanecem por mais tempo na cavidade bucal das crianças do que genótipos adquiridos de outras fontes.

Para a análise da estabilidade genotípica de *S. mutans* e *S. sobrinus* faz-se necessário conhecer quais os genótipos que iniciam a colonização da cavidade bucal, desta forma justificando o uso de uma técnica de genotipagem e o rastreamento epidemiológico longitudinal. Ainda, um acompanhamento freqüente da colonização das crianças por estes microrganismos, pode identificar os fatores bacterianos importantes para a colonização da cavidade bucal de bebês por este grupo de microrganismos e, ajudar no estabelecimento de medidas preventivas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estreptococos grupo mutans e cárie dental

O grupo mutans de estreptococos orais é constituído por sete espécies: *Streptococcus cricetus*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. mutans*, *S. rattus* e *S. sobrinus* (WHILEY & BEIGHTON, 1998). Esta classificação é baseada em diferenças nas características genéticas, antigênicas e bioquímicas. Dentre as espécies desse grupo, *S. mutans* e *S. sobrinus* são isolados com maior frequência da placa dental e estão fortemente associados à cárie dentária humana (HAMADA & SLADE, 1980; LOESCHE, 1986; LINDQUIST & EMILSON, 1991a; SEOW, 1998).

Estudos epidemiológicos têm relatado a prevalência de *S. mutans* e *S. sobrinus* na cavidade bucal humana, sendo que a frequência de isolamento de *S. mutans* na placa dental é maior do que a de *S. sobrinus* (van PALENSTEIN HELDERMAN, 1983; LOESCHE, 1986; NAPIMOGA *et al.*, 2001; MATOS NASCIMENTO *et al.*, 2001; STIPP *et al.*, 2002). Entretanto, num número seletivo de indivíduos, foi reportada uma elevada frequência de *S. sobrinus* (LINDQUIST, 1991). Ainda, poucos estudos relataram isolar apenas *S. sobrinus* como única espécie de estreptococos grupo mutans, e indivíduos que albergavam ambos *S. mutans* e *S. sobrinus* tendem a apresentar contagens maiores de estreptococos grupo mutans na saliva do que indivíduos que albergam apenas *S. mutans* (KÖHLER *et al.*, 1988).

A virulência dessas espécies está diretamente relacionada à capacidade de metabolização da sacarose em polissacarídeos intra e extracelulares (relacionados com aderência), sua capacidade acidogênica e acidúrica, bem como produção de mutacinas, que são proteínas antibacterianas (bacteriocinas) capazes de inibir o crescimento de outras

bactérias genética e ecologicamente relacionadas; sua síntese também pode estar diretamente relacionada com a transmissão de *S. mutans*, favorecendo a formação e manutenção da placa cariogênica na superfície dentária (JACOB *et al.*, 1953; HIROSE *et al.*, 1993; GRÖNROOS *et al.*, 1998).

A cárie é uma doença infecciosa e transmissível (KEYES, 1960; CAUFIELD, 1997) de origem multifatorial, que é caracterizada pela desmineralização dos tecidos não descamantes que compõem o corpo dental, em decorrência de um desequilíbrio da microbiota residente da cavidade bucal pela presença freqüente de carboidratos fermentáveis (MARSH, 1991; NYVAD, 1993; BOWDEN & EDWARDSSON, 1995). Fenômeno este potencializado em um hospedeiro susceptível, cujos fatores que contribuam para a desorganização (BUISCHI & AXELSSON, 1997) ou a “neutralização” (SEOW, 1998) da placa dentária cariogênica acumulada sobre a superfície dentária não estejam sendo eficientes.

Embora se acredite que a atividade de cárie na dentição decídua seja diretamente dependente do aumento nos níveis de estreptococos grupo mutans e do seu estabelecimento precoce na cavidade bucal (KÖHLER *et al.*, 1988; FUJIWARA *et al.*, 1991), em um grupo minoritário de crianças colonizadas por estes estreptococos, uma redução subsequente dos níveis bucais destes microrganismos parece estar acompanhada ao não desenvolvimento da doença (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001a). Além disso, estreptococos grupo mutans podem ser detectados em altos níveis até mesmo em crianças livres de cárie (CARLSSON *et al.*, 1985; MATEE *et al.*, 1993; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001a).

O desenvolvimento do biofilme dental ocorre em duas fases distintas. Durante a primeira fase, proteínas de superfície bacteriana interagem com o hospedeiro ou com

produtos bacterianos adsorvidos à superfície dentária. Na segunda fase, um biofilme se forma com bactérias acumuladas pela coagregação com a mesma espécie ou com outras espécies e produção de uma matriz polissacarídica extracelular (KOLENBRANDER, 2000). *Streptococcus* grupo mutans expressam algumas adesinas importantes na colonização inicial dos dentes (DEMUTH *et al.*, 1990), entretanto, não são considerados bons colonizadores primários dos dentes uma vez que há outros estreptococos orais que apresentam adesinas de maior afinidade à película adquirida, tais como *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus oralis* (KOLENBRANDER & LONDON, 1993). As espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* secretam várias proteínas extracelulares que podem estar envolvidas na colonização de superfícies orais, sendo importantes na segunda fase do desenvolvimento do biofilme dental e em atividades metabólicas que levam à iniciação da lesão de cárie dentária (HAMADA & SLADE, 1980; LOESCHE, 1986). Elas incluem glicosiltransferases, frutossiltransferases, dextranases, frutanasas, proteínas ligantes de glucano e proteínas associadas à parede – receptores de superfície SpaP (também conhecidos como Pac, antígeno I/II, B, P1, SR MLS-1 e IF) e antígeno A associado à parede - WapA (AJDIC *et al.*, 2002).

A sacarose serve como substrato para diversas enzimas extracelulares que sintetizam polímeros importantes na colonização e na patogênese da cárie. Alguns dos polímeros sintetizados a partir da sacarose promovem a aderência e acúmulo bacteriano na superfície dentária. Outros polímeros fornecem uma fonte de carboidratos para o metabolismo durante períodos de escassez de nutrientes. A importância dos polissacarídeos extracelulares de *S. mutans* na cariogenicidade é suportada por pesquisas que mostram

redução na virulência em mutantes incapazes de sintetizar aqueles polímeros (SCHROEDER *et al.*, 1989; MUNRO *et al.*, 1991; YAMASHITA *et al.*, 1993).

2.2. Aquisição e colonização de estreptococos grupo mutans

A colonização da cavidade bucal do ser humano se inicia durante o nascimento e a sucessão de bactérias continua por toda a vida (BOWDEN & EDWARDSSON, 1995). Crianças com um ecossistema bucal em desenvolvimento são particularmente susceptíveis à colonização bacteriana. A aderência de microrganismos às diferentes superfícies que ocorre de um modo seletivo é o evento inicial na colonização bacteriana (GIBBONS, 1984). O número de células bacterianas viáveis e sua habilidade de aderência são pré-requisitos fundamentais para o sucesso da colonização microbiana (GIBBONS & van HOUTE, 1971; 1975). Na cavidade bucal, somente as superfícies mucosas (palato, rodete gengival, dorso de língua, mucosa jugal) estão susceptíveis à colonização durante os primeiros meses de vida. Após o irrompimento dos dentes, ocorre um aumento significativo do número de sítios disponíveis para a aderência (sulco gengival ou bolsa e superfícies duras dos dentes ou de materiais restauradores). As bactérias não se aderem somente às superfícies bucais, mas também a outras bactérias, formando comunidades multigenéricas onde o padrão de relação específica influencia sua composição e estabelecimento (KOLENBRANDER & ANDERSEN, 1986). As bactérias encontradas na saliva constituem células bacterianas desalojadas provenientes dessas superfícies (GIBBONS *et al.*, 1964; DENEPITIYA & KLEINBERG, 1982).

Interações entre diferentes espécies bacterianas, que podem inibir ou estimular o crescimento de outras bactérias, também exercem uma influência significativa na

composição e estabilidade da microbiota bucal (LOESCHE, 1968; GRENIER & MAYNARD, 1986; WYSS, 1989). A presença ou ausência de espécies antagonistas e os patógenos invasores pode determinar o status de saúde ou doença (HILLMAN *et al.*, 1985; SOCRANSKY *et al.*, 1988).

Ao nascimento, os estreptococos grupo mutans não estão presentes na cavidade bucal da criança (DASANAYAKE *et al.*, 1993), podendo estabelecer-se no momento em que a erupção do primeiro dente decíduo ofereça condições propícias para seu desenvolvimento, devido ao estabelecimento do novo micro-ambiente de superfície dura e não descamante (BERKOWITZ *et al.*, 1975; BOWDEN & EDWARDSSON, 1995; BERKOWITZ, 1996). Existem relatos da presença destes microrganismos em amostras de saliva coletadas de crianças edêntulas (EDWARDSSON & MEJARE, 1978; WAN *et al.*, 2001; FLÓRIO *et al.*, 2002; TANNER *et al.*, 2002), no entanto para que a colonização seja persistente é necessária a presença de superfícies que não descamem, como as oferecidas após a erupção dentária (BERKOWITZ *et al.*, 1975; CAUFIELD *et al.*, 1993; BERKOWITZ, 1996). Um maior número de dentes irrompidos parece aumentar a frequência de isolamento de estreptococos grupo mutans (CATALONATO *et al.*, 1975; FUJIWARA *et al.*, 1991).

Sugere-se que o sucesso na colonização da cavidade bucal da criança apresenta grande dependência da magnitude de inoculação (KORESTEIN *et al.*, 1995). O nível de estreptococos grupo mutans na saliva da mãe (BERKOWITZ *et al.*, 1981; BERKOWITZ, 1996) e a frequência de inoculação direta ou indireta (KRASSE, 1967; AALTONEN & TENOVUO, 1994) apresentam relação diretamente proporcional com o nível de infecção infantil. Além disso, a precocidade da erupção dos dentes decíduos torna a criança mais

susceptível à aquisição de estreptococos grupo mutans (LI & CAUFIELD, 1995) pelo estabelecimento precoce do ambiente propício para a colonização efetiva.

A época em que ocorre a infecção por estreptococos grupo mutans é importante para prevenção da doença cárie, porém, diferenças nas populações estudadas e nas análises microbiológicas podem contribuir para taxas de detecção diversas dessas espécies. CAUFIELD *et al.* (1993) observaram, através de método de cultura, que a aquisição inicial de estreptococos grupo mutans por 82,6% das crianças da amostra de seu estudo (38/46), ocorreu em um período delimitado denominado “janela de infectividade” entre os 19º e 31º meses de vida (26º de vida em média). Este período apresentou coincidência com a erupção dos molares decíduos, cujas superfícies oclusais retentivas favorecem a colonização por estreptococos grupo mutans. Este fato também foi observado em estudos com modelos animais (SCHUSTER *et al.*, 1978; OOSHIMA, 1988), tendo sido demonstrada uma relação entre a emergência dos dentes posteriores decíduos e a suscetibilidade da colonização. Entretanto, contrariando estes achados, o estudo de WAN *et al.* (2001), também utilizando o método de cultura, detectou a presença de *S. mutans* em 60% das 172 crianças desdentadas, com 6 meses de idade, e confirmou seus resultados numa segunda avaliação microbiológica realizada 3 meses após a primeira. Já, o estudo de TANNER *et al.* (2002), utilizando a técnica de *checkerboard DNA probe*, detectou a presença de *S. mutans* e *S. Sobrinus* em 72% das 171 crianças, com idade menor que 18 meses.

Uma avaliação da prevalência de estreptococos grupo mutans em crianças brasileiras com 12 a 31 meses de idade e residentes em Piracicaba (SP), mostrou que 70,8% das crianças já estavam infectadas antes dos 19 meses de idade (MATTOS-GRANER *et al.*, 1998). Corroborando com estes resultados, dados parciais de um estudo que vem sendo

realizado para a verificação da “janela de infectividade” em crianças de 4 a 28 meses de vida da mesma cidade apresentam como resultados preliminares a média de infecção persistente entre o 15º e o 16º mês de vida (FLÓRIO *et al.*, 2002), o que comprova que a época de contaminação por estes microrganismos pode variar de acordo com características epidemiológicas, sociais e culturais da população estudada (ALALUUSUA, 1991; HOROWITZ, 1998).

2.3. Transmissibilidade de estreptococos grupo mutans

A noção de que a mãe é a fonte principal da transmissão de microrganismos orais para os seus filhos foi inicialmente sugerida por KEYES (1960) através da utilização de modelos animais, onde verificou-se que o microrganismo responsável pelo início do processo cariioso era transmitido vertical e diretamente entre as gerações, de indivíduos infectados para aqueles não infectados (TANZER, 1995; CAUFIELD, 1997). Desde então, estudos vêm sendo realizados buscando embasar esta afirmação.

Os estudos para o conhecimento das vias de infecção baseados em indicadores de saúde dental tais como índices de cárie e contagens de estreptococos cariogênicos sugeriram que a via mais provável de transmissão dessas bactérias ocorria nos pares mãe-filho, infantes e/ou adolescentes (KÖHLER & BRATTHAL, 1978; van HOUTE *et al.*, 1981; KÖHLER *et al.*, 1983; ZICKERT *et al.*, 1983; KÖHLER *et al.*, 1984; BROWN *et al.*, 1985; ALALUUSUA *et al.*, 1989a; ALALUUSUA *et al.*, 1989b; MATEE *et al.*, 1992; AALTONEN & TENOVUO, 1994; ANTHONY & MUNSHI, 1997), embora existam variações em diferentes grupos étnicos (KORESTEIN *et al.*, 1995; CAUFIELD, 1997). Um estudo mais recente (THORILD *et al.*, 2002) procurou estabelecer a prevalência e a

possível relação da colonização bucal por *S. mutans* em pares mãe-filho (crianças com 18 meses e 3 anos de idade), sustentando através de seus resultados o conceito de transmissão vertical, enfatizando a importância dos componentes dietéticos e justificando medidas preventivas primárias de ação direta nas mães com altos níveis de colonização por *S. mutans*.

Além de estudo com indicadores de saúde dental, outros parâmetros têm sido investigados para determinar a ocorrência de similaridade entre cepas de estreptococos grupo mutans isoladas de pares de mães-filhos, tais como sorotipagem (BERKOWITZ *et al.*, 1975), os padrões de bacteriocinas (BERKOWITZ & JORDAN, 1975; ROGERS, 1980; DAVEY & ROGERS, 1984) a caracterização genotípica de plasmídeos e cromossomos celulares intrapares mães-filhos (CAUFIELD *et al.*, 1988; LI & CAUFIELD, 1995).

Dentre os estudos, utilizando características fenotípicas de isolados bacterianos, a avaliação do perfil de produção de mutacinas por isolados de pares mãe-filho tem sido uma das ferramentas empregadas para o estudo da transmissibilidade de estreptococos grupo mutans. O primeiro trabalho nesta linha de pesquisa foi realizado por BERKOWITZ & JORDAN (1975), onde verificaram que o padrão de produção de mutacinas analisado em 120 cepas *S. mutans* era semelhante entre 4 pares de mãe-filhos, indicando a transmissão maternal desta espécie. Posteriormente, ROGERS (1980) verificou, através da bacteriocinotipagem, que membros de mesma família compartilhavam de cepas *S. mutans* com o mesmo padrão mutacinogênico; ainda, foram examinados isolados das crianças que compartilhavam o mesmo ambiente na classe da escola e os resultados obtidos mostram a não ocorrência de transmissão entre elas.

GRÖNROOS *et al.* (1998), analisaram o nível de atividade de bacteriocinas (mutacinas) e a produção por *S. mutans* isolados da cavidade bucal de 19 pares mãe-filho, sendo que as crianças possuíam de 18 meses a 3 anos de idade. Ainda, foi avaliada por 2 anos a estabilidade da atividade mutacinogênica de cepas isoladas de mães e de crianças com 5 anos de idade não relacionadas (que não mantinham contato entre si). Um total de 145 cepas de estreptococos grupo mutans orais foram submetidos a sorotipagem, ribotipagem e mutacinotipagem. Foi observado que 88% das cepas produziram mutacina contra mais de 1 das 14 cepas indicadoras, representadas por estreptococos grupo mutans, *Streptococcus sanguinis*, *S. salivarius*, *S. oralis*, *S. gordonii* e *S. pyogenes*. As cepas de *S. mutans* mostraram maior atividade inibitória do que as cepas de *S. sobrinus*. Ribotipos idênticos tiveram perfil de atividade mutacinogênica similar dentro de um mesmo indivíduo, tanto inicialmente quanto na avaliação após o acompanhamento por 2 anos. As mães albergavam um total de 37 ribotipos diferentes. Não foram isolados *S. mutans* de 6 crianças. Segundo os autores, é provável que tenha ocorrido transmissão em 9 dos 20 pares, com base na presença de cepas idênticas, como determinado por ribotipagem e mutacinotipagem. As cepas de *S. mutans*, compartilhadas entre a mãe e sua criança, mostraram atividade inibitória de amplo espectro, se comparadas às cepas que não foram transmitidas. Em conclusão, a atividade mutacinogênica de isolados clínicos foi razoavelmente estável e este fator de virulência visto como sendo de importância clínica na colonização inicial por *S. mutans*.

Num estudo de van LOVEREN *et al.* (2000) foi avaliada a similaridade dos perfis de atividade de bacteriocinas de estreptococos grupo mutans em famílias em que as crianças foram colonizadas entre 5 e 11 anos de idade. Previamente, tinha sido mostrado

que a janela de infectividade para estreptococos grupo mutans está entre as idades de 19 a 31 meses (CAUFIELD *et al.* 1993), onde muitas crianças adquirem estreptococos grupo mutans transmitidos por suas mães. Entretanto, parte das crianças que escapam desta janela adquirem estreptococos grupo mutans numa idade posterior. Neste grupo, é esperado uma transmissão maternal menos prevalente. Doze famílias foram selecionadas aleatoriamente a partir de um grupo de crianças de 11 anos de idade, o qual era conhecido por ter adquirido estreptococos grupo mutans durante a faixa etária de 5 anos. Foram isoladas aproximadamente 30 cepas de estreptococos grupo mutans a partir da saliva das mães, pais e crianças. Todos os isolados foram testados pela técnica de mutacinotipagem, contra 21 cepas indicadoras. Em 7/12 pares mãe-filho os perfis de produção de bacteriocinas encontrados foram similares. Nos 8 pares pai-filho foram encontrados perfis de similaridade somente em duas ocasiões, em que todos os três (pai, mãe e criança) albergavam cepas com perfis similares. Em 4/8 pares pai-mãe foram encontrados perfis de produção de bacteriocina similares. Neste estudo, também se observou a transmissão entre casais em 50% (4/8) das famílias estudadas. Os resultados mostram que mesmo quando uma criança adquire estreptococos grupo mutans após a idade de 5 anos, podem existir similaridades entre estreptococos grupo mutans da mãe, do pai e da criança, sugerindo transmissão entre membros da mesma família.

Portanto, a comparação de biótipos de *S. mutans* entre diferentes indivíduos permitiu a identificação das mães como a principal fonte de infecção destas espécies (BERKOWITZ & JORDAN, 1975; DAVEY & ROGERS, 1984; MASUDA *et al.*, 1985), embora nem todos os mutacinótipos maternos tenham sido transferidos à criança

(ROGERS, 1980; BERKOWITZ & JONES, 1985; GRONROOS *et al.*, 1998; van LOVEREN *et al.*, 2000).

Com o intuito de utilizar marcadores epidemiológicos menos sujeitos à interferência técnica e, mais sensíveis, foram executados estudos de análise plasmidial em *S. mutans*. CAUFIELD *et al.* (1982) propuseram que o plasmídeo críptico pVA318 (MACRINA *et al.*, 1977) podia ser empregado como marcador epidemiológico, pois o mesmo é encontrado somente em cerca de 13% das cepas de *S. mutans*. Aqueles autores obtiveram que 40% das cepas plasmídeo-positivas isolados de crianças apresentavam homologia com cepas isoladas de membros de suas famílias (pais, irmãos e tios), demonstrando a manutenção e transmissão dessas cepas nas famílias. Posteriormente, CAUFIELD *et al.* (1988) empregaram o mesmo sistema num número de amostras maior que o utilizado anteriormente, buscando o polimorfismo para um segundo plasmídeo críptico pUA140 (CAUFIELD *et al.*, 1985). Esses autores obtiveram que os diferentes plasmídeos permaneciam conservados em cepas de *S. mutans* provenientes de grupos raciais específicos, possivelmente evoluindo com os mesmos. Outro dado relevante foi que cepas plasmídeo-positivas obtidas a partir de crianças apresentavam alta correlação com cepas isoladas de suas mães, reforçando a teoria da transmissão maternal.

Com o advento da biologia molecular, outras ferramentas se tornaram disponíveis para a tipagem bacteriana. Os estudos através de genotipagem de estreptococos grupo mutans também indicam que a transmissão de bactérias da mãe para o filho é a principal rota para a aquisição primária - transmissão vertical (KULKARNI *et al.*, 1989; CAUFIELD & WALKER, 1989; LI & CAUFIELD, 1995; ALALUUSUA *et al.*, 1996; KOZAI *et al.*, 1999; REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2000; KLEIN *et al.*, 2002).

Entretanto, a detecção de genótipos em crianças diferentes e que não foram encontrados nas mães ou outros membros da família indicam que estreptococos grupo mutans podem ser também adquiridos a partir de outras rotas - transmissão horizontal (REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998; KOZAI *et al.*, 1999; REDMO EMANUELSSON & THORQVIST, 2000; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b; KLEIN *et al.*, 2002).

KULKARNI *et al.* (1989) objetivando empregar um método mais sensível e reprodutível, que pudesse ser aplicado universalmente a todas as cepas, optaram pela utilização da técnica de análise por enzima de restrição - REA (*restriction enzyme analysis*) para a determinação de genótipos em 396 cepas de *S. mutans*, incluindo isolados de 58 indivíduos e 19 cepas de cada membro de 5 famílias (com idades e origens culturais e regionais diversas). Estes autores observaram que existe uma tendência de se encontrar determinados genótipos de *S. mutans* disseminados entre membros de uma família, sem contudo, se excluir a possibilidade da ocorrência de outros genótipos extrafamiliares em alguns membros dessas famílias. Ainda, este trabalho relatou que a frequência de isolamento dos genótipos intrafamiliares é superior a dos genótipos extrafamiliares, indicando que os primeiros são possivelmente os que colonizam os dentes anteriormente, o que levaria a sua predominância numérica. Esta última observação havia sido sugerida por outros autores (KRASSE *et al.*, 1967; DAVEY & ROGERS, 1984; CAUFIELD *et al.*, 1988).

Outro estudo utilizando o método genotípico através da análise do padrão de restrição (REA) foi realizado por CAUFIELD & WALKER (1989). Nesse estudo foram utilizados isolados de *S. mutans* provenientes de 3 pares mãe-filho obtidos no momento em que as crianças foram colonizadas pela primeira vez por esta bactéria (idade média de 14,7

meses; 10 isolados por indivíduo). Os resultados encontrados indicaram que cepas de *S. mutans* encontradas nas crianças exibiram perfil de restrição semelhante àquele encontrado nas respectivas mães, suportando a noção de que as mães transmitem *S. mutans* aos seus filhos.

Entretanto, para complementar os dados acima, o mesmo grupo de pesquisa ampliou o número de pares mãe-filho para fornecer dados mais precisos. Assim, o estudo de LI & CAUFIELD (1995) determinou a universalidade de genótipos de estreptococos grupo *mutans* entre mães e seus filhos no período inicial de aquisição. As bactérias orais de 34 pares mãe-filho foram monitoradas desde o nascimento até 3 anos de idade da criança, com intervalos de aproximadamente 3 meses. Para genotipagem foram analisados 9 isolados por indivíduo através de análise por REA. Genótipos de estreptococos grupo *mutans* em bebês apresentaram-se idênticos aos genótipos presentes nas mães em 71% dos pares mãe-filho estudados. Ainda, os genótipos detectados nas meninas mostravam concordância com os genótipos detectados nas suas mães 6 vezes maior que aqueles detectados nos meninos e suas mães. Além disso, verificaram que crianças negras apresentavam concordância com os genótipos detectados nas suas mães 5 vezes maior do que aqueles detectados em crianças brancas e suas respectivas mães. Este trabalho não relatou o número de genótipos detectados nas crianças. A homologia de genótipos entre mães e seus filhos a partir de colonização inicial sugere fortemente que cepas de estreptococos grupo *mutans* foram transmitidas da mãe para seu filho, sugerindo um possível papel do sistema imune da criança na seleção de qual tipo de microrganismo teria condições para a colonização, com preferência aos derivados da mãe.

Em 1996, ALALUUSUA *et al.*, investigaram a diversidade genotípica através de ribotipagem de 3 a 13 isolados de estreptococos grupo mutans da placa dental em 12 crianças de 1,5 a 3 anos de idade (6 crianças com cárie de mamadeira e 6 crianças livres de cárie) e da saliva das mães. Concluíram que em ambos os grupos de crianças, as mães provavelmente sejam o maior curso de infecção por estreptococos grupo mutans.

A análise por REA da distribuição intrafamiliar de genótipos de estreptococos grupo mutans, em 11 famílias chinesas incluindo mãe, pai e uma criança com 3 anos de idade, realizada por REDMO EMAUELSSON & WANG (1998) mostrou um padrão diferente daquele relatado para famílias ocidentais. Em 4 (36,36%) famílias as mães possuíam os mesmos genótipos detectados em suas crianças; em 3 famílias foram os pais que possuíam os mesmos genótipos detectados em suas crianças (27,27%); em 2 (18,18%) famílias todos os indivíduos albergavam genótipos idênticos; em 1 (9,1%) família apenas os pais compartilhavam genótipos idênticos; e, na última família nenhum dos membros possuía genótipos similares (9,1%). Portanto, ocorreu transmissão intrafamiliar em 7/11 (63,63%) das famílias analisadas.

Porém, essa tendência de infecção primária intrafamiliar não foi observada num estudo posterior realizado por REDMO EMANUELSSON *et al.* (1998) utilizando a técnica de genotipagem por REA. Estes avaliaram a similaridade de isolados de estreptococos grupo mutans (*S. mutans* e *S. sobrinus*) em 25 famílias suecas, incluindo 25 crianças com 3 anos de idade, suas mães e 18 pais. Os autores encontraram que, em apenas 11 famílias, os 3 membros estavam colonizados por estreptococos grupo mutans, sendo 5/11 casos de ocorrência de genótipos extrafamiliares nas crianças, contra 6/11 casos de ocorrência simultânea de um mesmo genótipo nas crianças e nas mães. Dessas 6 crianças, 5

albergavam apenas 1 genótipo (também encontrado na mãe) e 1 criança albergava 2 genótipos, sendo 1 da mãe e o outro de fonte desconhecida. Ainda, nenhuma das crianças albergava genótipos detectados nos seus pais, embora dois terços dos mesmos possuía níveis alto ou muito alto de estreptococos grupo mutans. Portanto, estes resultados sugerem que as crianças podem adquirir estreptococos grupo mutans tanto da família quanto de pessoas fora da família.

Ressalta-se que KOZAI *et al.* (1999), também utilizando a técnica de REA analisaram 1.908 isolados obtidos da placa dental de 76 indivíduos de 20 famílias (20 casais e 36 de seus filhos, dos quais 12 eram crianças em idade pré-escolar e 18 em idade escolar), resultando na identificação de 144 genótipos dos quais 114 (79,17%) eram *S. mutans* e 30 (20,83%) eram *S. sobrinus*. Entre 1 a 4 genótipos foram detectados a partir de cada indivíduo, e uma média de 2 a 7 genótipos foram detectados para cada família. Entre os 70 genótipos detectados nas crianças 36 (51,4%), sendo 28 de *S. mutans* e 8 de *S. sobrinus*, também foram isolados da mãe e 22 (31,4%), sendo 11 de *S. mutans* e 11 de *S. sobrinus*, eram semelhantes àqueles isolados dos pais das mesmas. Os outros 13 genótipos de *S. mutans* não correspondiam àqueles isolados dos pais. Também foram encontrados genótipos homólogos entre os casais. Estes resultados demonstram que pais e outras pessoas bem como as mães podem ser rotas de transmissão de *S. mutans* e *S. sobrinus*.

O estudo de LI *et al.* (2000) analisou a fidelidade de transmissão de estreptococos grupo mutans e correlacionou amamentação em 48 famílias chinesas incluindo mães (n=48), pais (n=42) e crianças com 2 a 3 anos de idade (n=50), das quais 27 eram meninos e 26 eram meninas. As crianças deste estudo freqüentavam duas creches. Um total de 710 isolados foi obtido de 46 mães, 36 pais e 39 crianças (em média 4-6 isolados por

indivíduo). Os resultados encontrados mostram que 66% (n=38) das crianças albergavam estreptococos grupo mutans, 70% foram amamentadas, e 46% revelaram-se cárie-ativas. A análise dos isolados por REA revelou que das 38 crianças colonizadas por estreptococos grupo mutans apenas 44,7% (17/38) possuíam genótipos similares aos detectados nas mães (42,1% eram meninas, e 47,4% eram meninos). Entre as crianças que albergavam genótipos idênticos aos detectados nas mães, 88% foram amamentadas e contra 12% das crianças que não foram amamentadas ($p=0,03$). As crianças que foram amamentadas por mais de 9 meses em sua maioria albergava genótipos idênticos aos encontrados na mãe ($p=0,04$) e apresentaram maior experiência de cárie (ceo-d=4,4) aos 3 anos de idade comparadas àquelas crianças que foram amamentadas por menos de 9 meses (ceo-d=1,4; $p=0,04$). Estes dados sugerem que amamentação, especialmente por períodos prolongados, pode ser relacionada com a fidelidade de transmissão e que pode contribuir para uma elevada prevalência de cárie. Estes autores sugeriram que a menor fidelidade de transmissão de mães para filho na população chinesa em relação à população americana por eles estudada (LI & CAUFIELD, 1995), sendo 44,7% e 71%, respectivamente, pode ser atribuída ao fato das crianças terem menor contato com suas mães biológicas, por freqüentarem creches, durante o período da janela de infectividade, sugerido por CAUFIELD *et al.* (1993).

Poucos estudos desta natureza foram realizados na população brasileira. SPOLIDÓRIO *et al.* (2001) utilizaram a técnica de AP-PCR para a identificação intrafamiliar de *S. mutans* em 22 famílias e os dados obtidos de que 3 pais, 7 mães e 12 irmãos contribuíram para a transmissão de *S. mutans* para os bebês, demonstraram que uso desta técnica pode ser útil na detecção do polimorfismo entre os isolados e estabelecimento do grau de similaridade intrafamiliar entre os mesmos.

Em adição, MATTOS-GRANER *et al.* (2001b) avaliaram a diversidade de estreptococos grupo mutans em crianças de berçários de creche pela técnica de AP-PCR. Foram avaliadas 35 crianças com idade entre 12 e 30 meses, e obtidos 76 isolados, dos quais 74 eram *S. mutans* e 2 eram *S. sobrinus* (1 ou mais isolados por criança). Vinte e quatro crianças tiveram 1 ou mais isolados de *S. mutans* testados e apresentaram 1 ou mais genótipos de *S. mutans*. Estes autores verificaram a presença de genótipos iguais de *S. mutans* entre 2 crianças que compartilhavam o mesmo ambiente numa creche, sugerindo transmissão horizontal deste microrganismo.

Em estudo realizado por KLEIN *et al.* (2002) com pares mãe-filho, verificou-se, no momento da aquisição, que as crianças avaliadas estavam colonizadas por 1 a 3 clones distintos, os quais na sua maioria eram geneticamente idênticos aos isolados das mães. Sugerindo, porém, que outras rotas de transmissão podem existir.

Em resumo, a coincidência de genótipos de estreptococos grupo mutans em pares mãe-filho descrita na literatura varia de 24% a 71%, possivelmente refletindo variações culturais e comportamentais relacionadas ao tipo e intensidade de contatos salivares entre mães e filhos (CAUFIELD, 1997), e principalmente a grande variedade de técnicas utilizadas para detecção de diversidade genotípica, assim como a população alvo e número de isolados. Ainda, pode estar associado a variações na suscetibilidade individual das crianças, incluindo o período denominado “janela de infectividade”, erupção dos molares, a ação de fatores salivares inespecíficos e do sistema imunológico de mucosas (CAUFIELD, 1997).

2.4. Diversidade de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* em crianças

A diversidade genotípica de espécies de *S. mutans* e *S. sobrinus* provavelmente resulta na colonização dental por genótipos com diferentes características de virulência (CAUFIELD, 1997). Ainda, no ambiente oral, a aquisição de fragmentos de DNA a partir de organismos diferentes (plasmídeos, transposons) ou de novos traços através de mutações, podem alterar os microrganismos em relação ao seu genótipo e/ou fenótipo (SOLOMON & GROSSMAN, 1996; BOWDEN & HAMILTON, 1998).

No estudo realizado por KULKARNI *et al.* (1989), número de genótipos detectados por REA em crianças variou conforme a idade das crianças. Crianças com 14, 9, 8 e 6 anos de idade albergavam 3, 1, 5 e 3 genótipos diferentes, respectivamente. Entretanto, CAUFIELD & WALKER (1989) avaliando o número de genótipos através de REA em 3 famílias, encontraram apenas um único genótipo nas crianças (14,7 meses de idade em média) no momento em que *S. mutans* foi detectado pela primeira vez na placa dessas crianças.

Num estudo posterior realizado por LI & CAUFIELD (1995) em que relata a fidelidade de aquisição de genótipos de estreptococos grupo mutans pelas crianças a partir de suas mães no momento em que as crianças mostraram-se colonizados por este microrganismo não há relato do número de genótipos detectados no momento da aquisição.

Em 1996, ALALUUSUA *et al.* investigaram a diversidade genotípica através de ribotipagem de 3 a 13 isolados de estreptococos grupo mutans da placa dental em 12 crianças de 1,5 a 3 anos de idade (6 crianças com cárie de mamadeira e 6 crianças livres de cárie) e da saliva das mães. Os resultados deste estudo mostram que crianças com cárie de mamadeira, expostas a um consumo freqüente de sacarose, possuem uma alta proporção de

estreptococos grupo mutans na placa e 4 delas estavam colonizadas por mais de um ribotipo (2 ribotipos), enquanto as crianças livres de cárie possuem uma menor proporção de estreptococos grupo mutans na placa e apenas 1 delas possuía mais de 1 ribotipo. Mães de crianças com cárie de mamadeira possuíam níveis e números similares de ribotipos de estreptococos grupo mutans na saliva aos apresentados pelas mães das crianças livres de cárie. Este estudo concluiu que crianças com cárie de mamadeira não estão apenas pesadamente colonizadas por estreptococos grupo mutans, mas também freqüentemente colonizadas por mais de um genótipo. Nestas crianças para a aquisição de tais genótipos, o consumo freqüente de açúcar pode ter um papel importante. A sacarose facilita o aumento de níveis de estreptococos grupo mutans na placa dental, pois a partir deste carboidrato tais microrganismos sintetizam glicanos que favorecem sua aderência e acúmulo na placa dental (HAMADA & SLADE, 1980; LOESCHE, 1986).

KREULEN *et al.* (1997) também compararam crianças com e sem cárie de mamadeira dentro da mesma família (n=7) e suas mães em relação ao número e genótipos de *S. mutans*. Ambas as crianças de cada família apresentavam histórico de uso de mamadeira. Trinta ou mais isolados de *S. mutans* foram analisados por AP-PCR. Foi encontrado apenas 1 genótipo em cada criança com cárie de mamadeira (da lesão de cárie dos incisivos, dos sítios não cariados nos molares, e da língua), a idade destas crianças variou de 3,0 a 4,8 anos. As crianças sem cárie apresentavam uma maior variação no número de genótipos, pois elas albergavam de 2 a 5 clones tanto na placa dental dos incisivos quanto dos molares; a idade destas crianças variou de 4 a 10 anos. O estudo de KREULEN *et al.* (1997) encontrou um nível de detecção de 90%, refletindo uma relação inversa entre o número de genótipos de *S. mutans* e cárie de mamadeira. Isto sugere que

possa ocorrer uma seleção de genótipos de *S. mutans* mais virulentos quando a homeostasia da cavidade bucal está perturbada, possivelmente devido ao baixo pH oral. Estes resultados diferem daqueles encontrados por ALALUUSUA *et al.* (1996).

REDMO EMANUELSSON *et al.* (1998) utilizando a técnica de genotipagem por REA avaliaram isolados de estreptococos grupo mutans em 11 crianças de famílias suecas, com idade aproximada de 38 meses. Nove crianças albergavam apenas 1 genótipo e 2 crianças albergavam 2 genótipos distintos.

KOZAI *et al.* (1999), também utilizando a técnica de REA, analisaram isolados de estreptococos grupo mutans em 36 crianças chinesas (12 eram crianças em idade pré-escolar e 18 em idade escolar). Esses autores encontraram de 1 a 3 genótipos distintos em cada criança, sendo que 7 crianças albergavam apenas 1 genótipo, 24 crianças albergavam 2 e 5 crianças albergavam 3 genótipos distintos.

Outro estudo também analisou genótipos de estreptococos grupo mutans através de REA em 50 crianças chinesas com 2 a 3 anos de idade (LI *et al.*, 2000). Este estudo apenas forneceu a média de 1,5 genótipos encontrados em todas as crianças nesta faixa etária.

GRÖNROOS & ALALUUSUA (2000) avaliaram a diversidade e o padrão de colonização de estreptococos grupo mutans intraindivíduo, utilizando um total de 50 amostras de sítios obtidas a partir de 7 crianças cárie-ativas, com idade entre 3 e 7 anos. Cinco dessas crianças também contribuíram com amostras de saliva. Dos 7 voluntários, foram isolados 90, 74, 81, 53, 83, 103 e 114 cepas representadas por *S. mutans* e *S. Sobrinus*. Estas cepas foram submetidas à análise por AP-PCR. As crianças albergavam de 1 a 4 genótipos de estreptococos grupo mutans – duas crianças albergavam apenas 1 genótipo, 3 crianças albergavam 2 genótipos, 1 criança albergava 3 genótipos e uma criança

albergava 4 genótipos diferentes. Em 3 das 7 crianças, a distribuição dos genótipos de *S. mutans* diferiu dependendo do sítio dentário, sugerindo que estreptococos grupo mutans podem colonizar de maneira seletiva sítios específicos de tecido duro. Amostragem de saliva foi eficiente para o isolamento de estreptococos grupo mutans, porém não revelou necessariamente todos os genótipos presentes. Portanto, para a análise qualitativa da colonização por estreptococos grupo mutans é necessário coletar-se amostras de múltiplos sítios da cavidade bucal, para a obtenção de uma microbiota mais representativa.

MATTOS-GRANER *et al.* (2001b) avaliaram a diversidade de estreptococos grupo mutans em crianças de berçários de creche pela técnica de AP-PCR. Foram obtidos 76 isolados (74 de *S. mutans* e 2 de *S. sobrinus*) de 35 crianças com idade entre 12 e 30 meses, dentre os quais foram detectados 1 ou mais genótipos por criança. Sendo que apenas 1 criança albergava 3 genótipos e 6 crianças albergavam 2 genótipos distintos. Ainda, observaram uma não associação entre diversidade genotípica de estreptococos grupo mutans e idade, número de dentes erupcionados, nível de estreptococos grupo mutans ou prevalência de cárie (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b).

Entretanto, ainda não estão disponíveis dados de estudos de diversidade genotípica de estreptococos grupo mutans no momento de aquisição dos mesmos pelas crianças brasileiras. O conhecimento de tais dados forneceria subsídios para a compreensão da dinâmica da microbiota em desenvolvimento e implementação de medidas preventivas no futuro.

2.5. Estabilidade de genótipos bacterianos na infância

Métodos de tipagem genotípica e/ou fenotípica são necessários para determinar a estabilidade de diferentes linhagens de espécies bacterianas. Alguns estudos mostraram que a heterogeneidade de genótipos é muito alta em pioneiros comensais da cavidade bucal, como o *S. mitis* (FITZSIMMONS *et al.*, 1996) e *Prevotella melaninogenica* (KÖNÖNEN *et al.*, 1994). Entretanto, uma heterogeneidade intraindividual limitada é encontrada entre as espécies que colonizam a cavidade bucal mais tardiamente, tais como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens* e *P. pallens* (ALALUUSUA *et al.*, 1993).

Uma vez estabelecidas, as espécies bacterianas tendem a persistir na cavidade bucal das crianças (CARLSSON *et al.*, 1970a; CARLSSON *et al.*, 1970b; KÖNÖNEN *et al.*, 1999). Utilizando método de cultivo e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), LUCAS *et al.* (2000) investigaram em duas ocasiões, com intervalo de aproximadamente 4 meses, a prevalência de estreptococos na cavidade bucal de 33 crianças (5 a 16 anos de idade). Esses autores, comparando as proporções de 9 espécies de estreptococos orais, relataram que esta microbiota em termos de espécie permaneceu estável, sendo que as espécies predominantes nas duas colheitas foram *S. salivarius*, *S. oralis* e *S. mitis*.

Entretanto, em termos de genótipos, a taxa de alternância ou rotatividade parece ser alta no início da infância, devido a natureza do desenvolvimento da microbiota oral (KÖNÖNEN, 2000). Dentre mais de 600 cepas de *S. mitis* (biovar 1) isoladas de duas famílias, incluindo dois bebês, coletadas 4 vezes com intervalo de 3 meses, alguns genótipos foram encontrados em adultos mas não em bebês nas diferentes colheitas (HOHWY, 1997). Em outro estudo usando 11 pares mãe-filho, com acompanhamento por 2

anos, mostrou-se que todas as cepas de *Prevotella melaninogenica* isoladas, exceto uma, foram reveladas como novas cepas durante o início da infância, enquanto a colonização de *P. melaninogenica* foi mostrada como sendo de notável estabilidade em adultos (KÖNÖNEN *et al.*, 1994). Em contraste, um outro estudo demonstrou a permanência de genótipos de *A. actinomycetemcomitans* que foram isolados principalmente de adolescentes ou adultos que apresentavam periodontite (SAARELA *et al.*, 1999). Portanto, espécies bacterianas diferentes podem ter uma dinâmica populacional diferenciada. Provavelmente, a transmissão de genótipos bacterianos diferentes entre indivíduos resulta pelo menos em uma colonização transitória principalmente em indivíduos com ecossistemas orais em desenvolvimento ou instáveis (KÖNÖNEN, 2000).

Para estreptococos grupo mutans os estudos de estabilidade iniciaram-se com ROGERS (1975). Este autor avaliou, através de mutacinotipagem, isolados de seis indivíduos examinados em 3 momentos distintos com intervalos de 6 meses, estes apresentaram o mesmo mutacinótipo em todas as colheitas, sugerindo a estabilidade da população desse microrganismo na cavidade bucal. Além de verificar a ocorrência de transmissão maternal de *S. mutans* num primeiro momento, ROGERS (1980), realizou colheitas após 2-3 meses, encontrando em alguns casos o mesmo mutacinótipo. Este achado confirma as suspeitas do estudo realizado anteriormente pelo mesmo autor (1975).

O estudo realizado por DAVEY & ROGERS (1984), utilizando bacteriocinotipagem para o estudo de transmissão intrafamiliar de *S. mutans*, também mostrou que biótipos detectados numa colheita inicial foram novamente detectados em nova colheita realizada após 6 meses, sugerindo estabilidade desta espécie na cavidade bucal de crianças e suas mães.

Existem poucos relatos na literatura tratando da estabilidade de genótipos de estreptococos grupo mutans em crianças, e estes sugerem que as cepas que iniciam a colonização da cavidade bucal tendem a se manter estáveis por diversos anos, embora alguns genótipos detectados inicialmente podem não ser novamente isolados anos mais tarde (CAUFIELD & WALKER, 1989; ALALUUSUA *et al.*, 1994; REDMO EMANUELSON & THORNQVIST, 2000, KLEIN *et al.*, 2002). Esta linha de pesquisa pouco explorada, parece ser de fundamental importância para o melhor entendimento da dinâmica de colonização da cavidade bucal humana por este grupo de microrganismos tão importantes no desenvolvimento da cárie dental.

Em 1989, KULKARNI *et al.* avaliaram isolados de *S. mutans* de uma família em 2 momentos: numa primeira colheita e em outra colheita realizada 6 meses depois. Na primeira colheita cada um dos pais albergava um único genótipo e, 6 meses depois os isolados apresentavam o mesmo perfil de restrição, demonstrando assim estabilidade desses genótipos. A criança dessa família não estava colonizada por *S. mutans*.

CAUFIELD & WALKER (1989) realizaram o primeiro estudo sobre a estabilidade de genótipos de *S. mutans* na cavidade bucal de crianças utilizando o método genotípico de análise do padrão de restrição (REA). Esse estudo utilizou isolados de *S. mutans* provenientes de 1 par mãe-filho obtidos no momento em que a criança foi colonizada pela primeira vez por esta bactéria (14,7 meses de idade). Os resultados obtidos indicaram que neste par a criança aparentemente adquiriu apenas um único genótipo da mãe, e que este ficou conservado na cavidade bucal dessa criança por um período de 3 anos. A mãe originalmente albergava 3 genótipos distintos, e dois deles foram conservados por 3 anos e um deles foi perdido ou não detectado na segunda avaliação. Portanto, os isolados 3 anos

após a primeira colheita mostraram um perfil semelhante ao encontrado pela primeira vez, mantiveram-se estáveis na cavidade bucal das crianças.

O estudo realizado por ALALUUSUA *et al.* (1994) avaliou a distribuição de sorotipos e ribotipos de estreptococos grupo mutans isolados de 7 crianças com 5 anos de idade acompanhadas até 10 ou 12 anos de idade sendo realizadas duas colheitas, e no total foram analisados 51 cepas. Os ribotipos encontrados eram únicos para cada criança. Em 5 crianças somente 1 ribotipo e sorotipo (c, e ou f) foi encontrado. Em uma criança 2 sorotipos (c e f) foram encontrados na primeira colheita e somente 1 sorotipo (c), na última colheita. Em uma única criança o mesmo sorotipo não foi encontrado nas duas colheitas – na primeira (sorotipo e) e na última (sorotipo c). Em todas as crianças exceto uma, os ribotipos foram idênticos aos encontrados 5-7 anos mais tarde. Esses resultados sugerem que, na idade de 5 anos, a infecção por *S. mutans* já está estabilizada e as cepas colonizadoras mantêm-se permanentes.

Outros dois estudos realizados por REDMO EMANUELSON *et al.* (1998) e REDMO EMANUELSON & THORNQVIST (2000), objetivando analisar a estabilidade de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* avaliou 11 famílias suecas (pais e filhos) em duas ocasiões: colheita das amostras numa primeira etapa, onde as crianças apresentavam-se com 3 anos de idade (REDMO EMANUELSON *et al.*, 1998), e a segunda colheita realizada 2 a 5 anos após a primeira (REDMO EMANUELSON & THORNQVIST, 2000). Para a análise genotípica o DNA dos isolados de *S. mutans* e *S. sobrinus* foi tratado com enzima de restrição. Comparando o DNA *fingerprinting* dos estreptococos grupo mutans na primeira e na colheita posterior, 9 crianças albergavam 1 ou 2 genótipos similares nas duas ocasiões em que foram realizadas as amostragens; 2 crianças restantes tinham perdido 1

genótipo cada e 1 delas tinha adquirido 2 novos genótipos. Todos os adultos apresentavam 1 a 2 genótipos idênticos àqueles encontrados na primeira colheita; 9 adultos também perderam 1 genótipo; 4 desses 9 adultos e ainda 4 dos outros adultos, apresentaram 1 ou 2 novos genótipos. Seis pares mãe-filho compartilhavam 1 genótipo na primeira colheita e este padrão permaneceu o mesmo em 5 pares até o final do estudo. Esses resultados sugerem que genótipos de estreptococos grupo mutans têm um grau de coerência em crianças entre 3 e 8 anos de idade, bem como em adultos, indicando a persistência (estabilidade) de cepas na cavidade bucal dos mesmos. Ainda, os resultados obtidos indicam que alguns indivíduos podem adquirir e/ou perder genótipos clones de *S. mutans* e/ou *S. sobrinus*.

Entretanto, vários estudos (CAUFIELD & WALKER, 1989; ALALUUSUA *et al.* 1994; REDMO EMANUELSON & THORNQVIST, 2000) têm considerado um intervalo entre a primeira colheita e a segunda relativamente grande de 2 anos no mínimo, pode-se considerar tal intervalo de tempo propício a reinfecção da cavidade bucal das crianças estudadas.

2.6. Métodos para análise genotípica

Métodos moleculares de tipagem possuem um maior poder discriminatório e confiabilidade quando comparados aos métodos tradicionais baseados na mensuração de propriedades fenotípicas, uma vez que os métodos genotípicos avaliam DNA do microrganismo estudado (SAARELA *et al.*, 1996).

A determinação se duas cepas de bactérias são idênticas ou não depende de comparações de características fenotípicas e/ou genotípicas. Um método de genotipagem de

cepas bacterianas é comumente referido como *fingerprinting* de DNA cromossômico (LI & CAUFIELD, 1998).

S. mutans e *S. sobrinus* apresentam heterogeneidade genética intra-espécies quando são empregadas técnicas e métodos para tipagem tais como análise por endonucleases de restrição (REA), polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP), reação em cadeia da polimerase usando *primers* arbitrários (AP-PCR) e eletroforese de campo pulsado (PFGE) (SAARELA *et al.*, 1996; LI & CAUFIELD, 1998; JORDAN & LeBLANC, 2002). Os diferentes métodos de tipagem genotípica empregados para isolados clínicos têm mostrado 1 até 10 tipos clonais de estreptococos grupo mutans em um mesmo indivíduo (ALALUUSUA *et al.*, 1996; ROSA *et al.*, 2001; GONÇALVES *et al.*, 2002; MATOS NASCIMENTO *et al.*, 2002).

A técnica de AP-PCR ou RAPD foi desenvolvida simultânea e independentemente por dois grupos de pesquisa (WELSH & McCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990). Os dois termos são amplamente aplicados, sendo que RAPD significa “DNA polimórfico amplificado ao acaso” (*random amplified polymorphic DNA*, em inglês) e AP-PCR, “PCR com *primer* arbitrário” (*arbitrarily primed PCR*, em inglês). Na técnica de AP-PCR, segmentos de DNA do organismo estudado são amplificados utilizando-se um ou mais *primers* de sequência arbitrária em condições de menor adstringência. A principal vantagem da técnica de AP-PCR é que não é necessário um conhecimento prévio da sequência de DNA da espécie bacteriana em estudo. Esta técnica é relativamente fácil e rápida para ser realizada. Os resultados encontrados por SAARELA *et al.* (1996) indicam que a técnica de AP-PCR tem uma boa habilidade discriminatória para diferenciar

genótipos de estreptococos grupo mutans e que esta técnica é apropriada para estudos epidemiológicos envolvendo este grupo bacteriano.

LI & CAUFIELD (1995) analisaram *fingerprinting* de DNA cromossômico através de análise por endonucleases de restrição (REA) de isolados de estreptococos grupo mutans para estudar a transmissão intrafamiliar desta bactéria. Posteriormente, LI & CAUFIELD (1998) utilizaram e avaliaram um método de reação em cadeia da polimerase usando *primers* arbitrários (AP-PCR) para caracterização genotípica de estreptococos do grupo mutans. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos a partir de *fingerprinting* de DNA cromossômico por REA, e verificou-se que AP-PCR demonstrou menor diversidade do que a análise por REA. Em seguida estes autores testaram a concordância entre REA e AP-PCR em determinar similaridade genotípica entre 21 cepas de estreptococos grupo mutans provenientes de 10 pares mãe-filho, e 5 cepas de estreptococos grupo mutans obtidas de pais. Os valores do Teste Kappa demonstraram concordância de 0,88. Portanto, esse estudo concluiu que AP-PCR, que gerou padrões de 8 a 12 *amplicons* (*primer* OPA-02), é capaz de distinguir cepas de estreptococos grupo mutans dentre indivíduos não relacionados. Além disso, AP-PCR pode distinguir tanto homogeneidade e heterogeneidade de genótipos de estreptococos grupo mutans entre pares mãe-filho. Sobretudo, LI & CAUFIELD (1998) encontraram que AP-PCR fornece resultados comparáveis àqueles obtidos por *fingerprinting* de DNA cromossômico por REA.

A técnica de AP-PCR foi utilizada por SPOLIDÓRIO *et al.* (2001) para a identificação intrafamiliar de *S. mutans* em 22 famílias brasileiras e os dados obtidos demonstraram que o uso desta técnica pode detectar polimorfismo entre os isolados e

estabelecer o grau de similaridade intrafamiliar dos mesmos. Esta mesma técnica também foi utilizada por MATTOS-GRANER *et al.* (2001) para avaliar o polimorfismo de estreptococos grupo mutans isolados da cavidade bucal de crianças brasileiras.

Os dados descritos na presente revisão de literatura apresentam lacunas em diversos aspectos da colonização por *S. mutans* e *S. sobrinus*. Existem divergências quanto às taxas e rotas de transmissão destes microrganismos; em relação à diversidade de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* no momento da aquisição inicial e sua estabilidade durante a colonização da cavidade bucal das crianças nas diferentes populações estudadas. Deste modo, são necessárias mais pesquisas neste campo para se estabelecer um conhecimento mais concreto do perfil de colonização na população brasileira.

3. PROPOSIÇÃO

Através da revisão de literatura, verifica-se que há variação na fonte de infecção, na diversidade e estabilidade de genótipos de *S. mutans* e de *S. sobrinus*. Deste modo, este trabalho de tese foi realizado com o objetivo de verificar:

- a ocorrência de transmissão vertical entre pares mãe-filho, e de transmissão horizontal entre as crianças que compartilham o mesmo ambiente;
- a diversidade de genótipos na criança no momento da aquisição inicial e durante rastreamento epidemiológico longitudinal;
- a estabilidade dos genótipos adquiridos (permanência na cavidade bucal durante o período médio de acompanhamento por 19,2 meses).

4. METODOLOGIA

Para o desenvolvimento da pesquisa foram selecionados isolados de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de diferentes sítios da cavidade bucal de 16 pares mãe-filho acompanhados longitudinalmente – Comitê de Ética em Pesquisa #57/2000 (ANEXO 1) (FLÓRIO *et al.*, 2002). Os isolados, armazenados a -70°C em meio BHI glicerol a 20% na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP, foram analisados através da técnica de AP-PCR (Comitê de Ética em Pesquisa #099/2002) (ANEXO 2). Os isolados processados compreendem um período médio de acompanhamento por 19,2 meses, sendo que o menor e o maior período de acompanhamento foram 14,8 e 24,7 meses, respectivamente.

4.1. Obtenção dos isolados de *S. mutans* e *S. sobrinus*

4.1.1. Seleção dos voluntários

Inicialmente, foram examinados 280 pares-mãe filho, selecionados de forma aleatória em 8 creches municipais da cidade de Piracicaba, SP (FLÓRIO *et al.*, 2002). Destes, foram selecionados 33 pares com base nos seguintes critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão foram: 1) mães com idade entre 18 e 35 anos; nível sócio econômico entre C e E (SPOLIDÓRIO, 1997); não apresentando mais do que 4 dentes posteriores ausentes ou excessiva necessidade de tratamento restaurador e/ou periodontal; não estivessem fazendo ou tenham feito uso de nenhuma substância antimicrobiana ou imunossupressora há pelo menos três meses antes do início do estudo; residentes há pelo menos dez anos na cidade de Piracicaba. Além de apresentarem contagens salivares para estreptococos grupo mutans

acima de 10^6 UFC/mL. 2) filhos na faixa etária de $6 (\pm 2)$ meses de vida; matriculados em berçários de creches municipais da cidade de Piracicaba (S.P.); cujos primeiros dentes decíduos não estavam erupcionados e que também não estivessem fazendo ou tenham feito uso de antimicrobianos ou imunossupressores. Quanto aos critérios de exclusão além do não enquadramento nos itens anteriores, foram excluídos da pesquisa voluntários com deficiência mental, pacientes com doenças que impedissem o diálogo e o entendimento das instruções (FLÓRIO *et al.*, 2002).

A partir dos 33 pares mãe-filho selecionados por FLÓRIO *et al.* (2002), foram utilizados no presente estudo 16 pares de mãe-filho, cujas crianças estavam na faixa etária de $6 (\pm 2)$ meses de vida, de ambos os sexos, matriculadas em creches municipais -EMEIS- da cidade de Piracicaba (SP). Cidade abastecida com água potável fluoretada (0,7 ppm F) desde 1971, em cujo CPOD para crianças de 12 anos apresenta um valor médio igual a 1,7 (KOSLOWSKI, 2002) considerado baixo segundo a classificação da OMS (1993). Autorização para a realização do estudo em questão foi solicitada aos responsáveis tanto pela Secretaria de Saúde e Educação da cidade de Piracicaba (SP) quanto pelas creches envolvidas no estudo. Ainda, obteve-se a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido das mães, para a inclusão das mesmas e de seus filhos no estudo.

Os 16 pares mãe-filho voluntários foram acompanhados por um período de 19,2 meses (FLÓRIO *et al.*, 2002). Foram realizadas avaliações bimestrais microbiológicas e clínicas.

4.1.2. Procedimentos realizados nos voluntários

Através de exames realizados na creche, informações referentes à condição bucal inicial da mãe e da criança foram obtidas (FLÓRIO, M.F.) (FLÓRIO *et al.*, 2002). Nas crianças, foram realizadas colheitas microbiológicas bimestrais além da verificação da qualidade de higiene bucal. Para as mães, foram agendadas semestralmente consultas odontológicas realizadas no consultório localizado no Laboratório de Cariologia (da área de Odontologia Preventiva e Saúde Pública, localizado no prédio da Escola Técnica da FOP – UNICAMP) para acompanhamento das condições clínicas e colheitas microbiológicas.

4.1.2.1. Estabelecimento das condições bucais iniciais e acompanhamento

Previamente à realização dos exames clínicos nos voluntários do estudo, houve um treinamento da examinadora responsável (FLÓRIO, M.F.), envolvendo a discussão teórica dos critérios, códigos e técnicas referentes aos exames realizados. Os exames foram realizados em 4 mulheres e 4 pré-escolares não participantes do estudo, na mesma população e nas mesmas condições. Tanto na fase de calibração, quanto na de reprodutibilidade, realizada uma semana após o exame inicial, o erro intra-examinador apresentou-se dentro de um padrão estatístico aceitável ($Kappa > 0,85$) (LANDIS & KOCH, 1977).

Através de exames clínicos realizados nas creches para as crianças e no consultório odontológico para as mães, foram obtidas informações referentes à condição bucal inicial dos voluntários.

As mães foram submetidas à verificação da condição periodontal - índice de higiene oral simplificado (GREENE e VERMILLION, 1964) e da história passada e atual de cárie

através do índice CPOD (KLEIN *et al.*, 1938), e tiveram suas cavidades bucais adequadas, sendo que as voluntárias que necessitaram de tratamentos endodônticos, cirurgias periodontais e extrações dentárias foram encaminhadas para a clínica de graduação ou foram acompanhadas no plantão de urgências da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP).

Durante as consultas odontológicas as mães receberam as Instruções para Educação em Saúde Bucal, envolvendo os conceitos relacionados à transmissibilidade da cárie dentária e à importância da manutenção da saúde bucal e da transferência de hábitos saudáveis de higiene e alimentação para a criança. Instruções de higiene bucal (uso correto do fio dental e escovação melhorada nos locais em que a higiene estava deficiente, através da coloração da placa bacteriana) foram realizadas na frente de um espelho nas consultas necessárias para a adequação. Kits de higiene compostos por escovas de dente para cada residente da casa e um folheto ilustrativo direcionado para crianças edêntulas foram entregues na primeira consulta.

A cada dois meses as crianças foram submetidas ao exame clínico da cavidade bucal e também foram realizadas colheitas microbiológicas: colheita de saliva/placa da criança .

Com a ajuda das agentes de saúde, a cada 2-3 meses, um novo kit de higienização bucal foi entregue para as mães, acompanhado do folheto ilustrativo direcionado às crianças cujos dentes já estavam erupcionados e de um bilhete relatando a qualidade da higiene bucal verificada no dia da visita de acompanhamento, objetivando-se a motivação para a melhora ou um reforçamento positivo em situações de higiene adequada.

4.1.3. Procedimentos microbiológicos

4.1.3.1. Colheita da amostra para análise microbiológica

Nas crianças, a colheita de saliva foi realizada através da utilização de *swabs* esterilizados conforme metodologia utilizada por DASANAYAKE *et al.* (1993). Enquanto a criança permaneceu edêntula, foram três os sítios de colheita: região sublingual, dorso da língua e rodets gengivais. A partir da erupção do primeiro dente, verificada nas colheitas de acompanhamento, foi realizada também a colheita da placa bacteriana de todos os dentes irrompidos além dos três sítios acima citados. Como protocolo, um *swab* foi delicadamente passado em cada um dos sítios, por 10 segundos para a completa saturação do algodão. Após a colheita os *swabs* tiveram suas pontas imediatamente cortadas e depositadas no interior de tubos *ependorf* contendo solução salina 0,9% que foram, por sua vez, devidamente codificados e armazenados na geladeira de transporte em banho de gelo.

A saliva integral da mãe foi coletada, no momento em que a primeira colheita da criança mostrou-se positiva para *S. mutans* e/ou *S. sobrinus*, em um tubo com rosca esterilizado, conforme a metodologia proposta por TENOVUO & LAGERLÖF (1995). A voluntária estava em jejum de uma hora antes da colheita, além de não ter fumado ou realizado exercício físico. O fluxo salivar foi estimulado através da mastigação de um pedaço de parafina (Parafilm[®]; 4 X 2 cm), durante 1 minuto quando a saliva formada foi desprezada. Em seguida iniciou-se a colheita em um dispositivo^γ previamente autoclavado. Após a obtenção de aproximadamente 2 mL de saliva estimulada, o conjunto ponteira/papel

^γ Adaptou-se uma ponteira de 1000 µl com a ponta cortada em um tubo de ensaio com tampa de rosca. O conjunto é então envolvido com um pedaço de papel alumínio, o que possibilitou que durante a colheita, não houvesse contato entre a rosca do tubo e os lábios e/ou dedos da voluntária.

alumínio foi cuidadosamente removido. O tubo foi flambado, codificado e devidamente acondicionado em banho de gelo.

4.1.3.2. Processamento do material coletado:

Logo após o término da colheita, as amostras foram imediatamente transportadas ao laboratório de Microbiologia (FOP/UNICAMP), num período máximo de 2 horas.

Visando a obtenção de uma suspensão uniforme, submeteu-se as amostras a 60 segundos de vibração em um agitador de tubos (Phoenix - AT 56), para posterior diluição em série decimal de 10^{-1} a 10^{-4} , em solução salina 0,9%.

Em seguida, procedeu-se a inoculação das amostras. Para o cultivo dos estreptococos grupo mutans, alíquotas de 5µL de cada diluição foram inoculadas em duplicata em placas de Petri (5 x 2 cm), contendo 5 mL de meio ágar *Mitis Salivarius* com bacitracina 200 U/L, 15% de sacarose e telurito de potássio a 1% - MSB (GOLD *et al.*, 1973).

4.1.3.3. Isolamento Bacteriano

Após incubação, a 37°C por 48 horas em atmosfera com pCO₂ de 10% (Water-Jacked CO₂ Incubators/Cole Parmer Instruments – USA), havendo crescimento positivo nas placas inoculadas com amostras das crianças, até 30 colônias de morfologia característica foram isoladas das placas inoculadas com amostras de todos sítios, sendo proporcional o número de isolados obtidos de cada sítio. Observou-se neste momento, além da morfologia celular, a produção de enzima catalase através do gotejamento de peróxido de hidrogênio a 3% sobre uma colônia de cada tipo morfológico depositada sobre uma lâmina de vidro. A

prova foi considerada positiva quando ocorreu o desprendimento de bolhas (WHITTENBURY, 1964). A morfologia celular também foi examinada microscopicamente em esfregaços das culturas coradas pelo método de Gram. Apenas células que apresentaram morfologia colonial e celular típica de estreptococos grupo mutans e que apresentaram resultado negativo na prova de produção de enzima catalase foram isoladas.

As colônias com tais características foram transferidas individualmente para tubos contendo 3 mL de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas em condições ótimas para seu desenvolvimento celular (37°C, 10% CO₂). Após o crescimento bacteriano, alíquotas de 500 µL do subcultivo foram armazenadas a -70°C em BHI-Glicerol 20%, para análises posteriores. A pureza dos isolados armazenados foi conferida através de coloração pelo método de Gram.

Seguindo o mesmo protocolo anteriormente descrito, 15 colônias com morfologia típica foram isoladas das placas inoculadas com a saliva das mães nas colheitas realizadas.

4.1.3.3. Identificação por PCR

Para obtenção do DNA bacteriano, os isolados conservados a -70°C em BHI-Glicerol, foram reativados em meio BHI e incubados a 37°C por 24 horas em atmosfera com pCO₂ de 10% . Após o crescimento bacteriano, as células foram centrifugadas (10.000 r.p.m./2 mim). Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 800 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0). Após agitação e nova centrifugação nas mesmas condições, as células foram ressuspensas e lavadas por mais duas vezes, para então serem submetidas a um banho de fervura por 10 minutos em 100µL de TE (modificado de SAARELA *et al.*, 1996). Após centrifugação (10.000 r.p.m./10 seg) e

transporte do sobrenadante para outro tubo tipo *eppendorf* obteve-se as amostras de DNA. A concentração de DNA foi calculada medindo a absorbância a 260nm (GENESYS 10uv, Spectronic Unicam), e as amostras também foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para verificar as condições de degradação das mesmas. Alíquotas destas amostras de DNA (extratos celulares) foram conservadas a -20°C , para posterior utilização nos experimentos de AP-PCR.

As amostras de DNA foram submetidas à Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) para confirmação molecular da identidade de *S. mutans* e, posteriormente, de *S. sobrinus* na presença de pares *primers* específicos para a porção do gene correspondente a glicosiltransferase (*gtfB* de *S. mutans*, *gtfI* de *S. sobrinus*) listados na TABELA 1.

TABELA 1: *Primers* utilizados para identificação *S. mutans* e de *S. sobrinus* pela técnica de PCR (OHO *et al.*, 2000):

| Espécie | <i>Primes</i> : Sequência | Posição |
|--------------------|---|----------|
| <i>S. mutans</i> | GTFB-F: 5'- ACT ACA CTT TCG GGT GGC TTG G - 3' GTFB-R: 5'- CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C -3' | (517 pb) |
| <i>S. sobrinus</i> | GTFI-F: 5'- GAT AAC TAC CTG ACA GCT GAC T - 3' GTFI-R: 5'- AAG CTG CCT TAA GGT AAT CAC T -3' | (712 pb) |

A reação de PCR foi processada em 25µL de uma mistura de reagentes contendo 1X solução tampão (10X Reaction Buffer Taq Polymerase, INVITROGEN® – Life Technology do Brasil), 1,5 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de dNTP (DNA Polymerization Mix; INVITROGEN® – Life Technology do Brasil), 0,2 µM de cada *primer*, 1,5 U de Taq DNA

Polymerase (INVITROGEN® – Life Technology do Brasil) e uma alíquota de 2,5 µL de cada amostra de DNA. Além das amostras, em cada reação de PCR, foram utilizados controles positivos, DNA extraído de *S. mutans* (CCT 3440) e de *S. sobrinus* (ATCC 27607), e negativo (água bi-destilada e deionizada).

Esta mistura reagente foi submetida a um aparelho termociclador convencional (GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer) com o *primer* para *S. mutans* de acordo com as seguintes condições térmicas: 30 ciclos de desnaturação do DNA a 95°C por 30 segundos, seguida da fase de hibridização dos *primers* a 59° C por 30 segundos e fase de extensão a 72°C por 1 minuto (OHO *et al.*, 2000).

Para a confirmação molecular da identidade de *S. sobrinus*, realizada quando da ausência de banda que caracterize *S. mutans* na reação anterior, outra alíquota da amostra de DNA foi submetida a uma nova reação de PCR, realizada utilizando-se a programação supracitada, agora com o *primer* específico para detecção de *S. sobrinus* (OHO *et al.*, 2000).

Os produtos da PCR foram analisados imediatamente, ou armazenados em freezer a – 20°C. A análise dos produtos da PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (INVITROGEN® - Life Technology do Brasil) em tampão Tris-Borato-EDTA (pH 8,0). Em cada gel foi incluído um padrão de peso molecular de 100 pb (INVITROGEN® - Life Technology do Brasil). Após o término da corrida (60 volts por 1 hora), o gel foi corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL (INVITROGEN® – Life Technology do Brasil) e as bandas observadas com auxílio de um transluminador de luz ultravioleta (Pharmacia LKB –MacroVue).

4.2. Genotipagem por AP-PCR

As alíquotas de DNA dos isolados positivamente identificados como *S. mutans* ou *S. sobrinus* foram submetidas à técnica de genotipagem por AP-PCR.

4.2.1. AP-PCR

A reação de AP-PCR foi processada segundo SAARELA *et al.* (1996), utilizando-se 2 *primers* arbitrários: OPA-02 (5'TGCCGAGCTG 3') – *primer* com melhor poder discriminatório LI & CAUFIELD (1998) e OPA-13 (5'CAGCACCCAC3') (MATOS NASCIMENTO, 2002). Em torno de 350 ng de DNA foram adicionados a uma mistura de reagentes contendo 1X solução tampão (10X Reaction Buffer Taq Polymerase, INVITROGEN® – Life Technology do Brasil), 3,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP (DNA Polymerization Mix; INVITROGEN® – Life Technology do Brasil), 0,4 µM de *primer*, 2,5 U de Taq DNA Polymerase (INVITROGEN® – Life Technology do Brasil). Esta mistura reagente foi submetida a um aparelho termociclador convencional de acordo com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 min, hibridização do *primer* a 36°C por 2 min e extensão a 72°C por 2 min, concluindo com extensão a 72°C for 5 min.

Os produtos resultantes da amplificação por AP-PCR foram conservados a -20°C ou analisados imediatamente por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA (pH 8,0). Em cada gel foi incluído um padrão de peso molecular de 100 pb (INVITROGEN® - Life Technology do Brasil). Após o término de cada corrida (90 volts, 2 horas) o gel foi corado com brometo de etídio a 0,5 µL/mL (INVITROGEN^R – Life

Technology do Brasil) e as bandas observadas com auxílio de um transluminador de luz ultravioleta.

4.2.2. Análise do padrão eletroforético:

A documentação fotográfica foi obtida com o sistema Image Master -VDS (Pharmacia Biotech) e a captura das imagens foi realizada pelo programa computacional LISCAP. As imagens positivas e a demarcação das bandas eletroforéticas foram processadas através do programa Sigma Gel (Jandel Co.), para a obtenção da mobilidade relativa de cada banda (valores de R_f .) em função dos valores conhecidos dos padrões de tamanho/massa molecular (ROSA, 2000; ROSA, 2001; MATOS NASCIMENTO, 2002).

4.2.3. Construção das matrizes e Dendogramas de Similaridade:

As bandas eletroforéticas, representadas pelos valores de peso molecular foram convertidas em valores numéricos que receberam representações de 1 (um) para a presença e 0 (zero) para a ausência de bandas.

O conjunto de informações obtido gerou uma matriz de dados binários que foi submetida ao sistema NTSYS versão 1.7 (Applied Biostatistics), empregando-se o programa QUALITATIVE e o coeficiente de similaridade de DICE.

Através do mesmo pacote estatístico, as matrizes de similaridade foram submetidas ao programa SHAN CLUSTERING utilizando-se o algoritmo de agrupamento UPGMA (unweighte pair-group method with mathematic avarege) (SNEATH & SOKAL, 1973), para construção de dendogramas. Os dendogramas forneceram os graus de similaridade existentes e o agrupamento dos possíveis genótipos presentes entre os isolados bacterianos de *S. mutans* ou de *S. sobrinus*.

4.3. Forma de análise dos resultados

A análise da ocorrência de transmissão vertical de *S. mutans*, de *S. sobrinus* e de ambos *S. mutans* e *S. sobrinus* foi realizada pelo Teste Binomial para duas proporções. O Teste exato de Fisher foi utilizado para verificar se ocorreu diferença entre o número de pares em que ocorreu transmissão de *S. mutans* em relação ao número de pares que ocorreu a transmissão de *S. sobrinus*. Para detectar se o número de genótipos de *S. mutans* e de *S. sobrinus* detectados nas crianças e nas mães é dependente do número de isolados foi aplicado o Coeficiente de Correlação de Spearman. O teste do Qui-Quadrado foi utilizado para analisar a diversidade genotípica de *S. mutans* de *S. sobrinus* em relação: aos sítios em que foram detectados; ao número de dentes presentes no momento da aquisição inicial; e a idade da criança no momento em que foram detectados. Os testes foram aplicados pelo pacote estatístico *BioEstat* 2.0, e o nível de significância adotado foi de 5% ($p=0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento e Identificação de *S. mutans* e *S. sobrinus*:

A TABELA 2 mostra o total de isolados bacterianos provenientes de 16 pares mãe-filho e submetidos à identificação por PCR para confirmação molecular da identidade de *S. mutans* e *S. sobrinus* (ANEXO 3 – número de isolados por cada par mãe-filho).

TABELA 2: Identificação dos isolados bacterianos provenientes da cavidade bucal de 16 pares mãe-filho submetidos a rastreamento epidemiológico longitudinal.

| Indivíduo | Nº de isolados | | | Total |
|-----------|------------------|--------------------|-------------------|-------|
| | <i>S. mutans</i> | <i>S. sobrinus</i> | Não identificados | |
| Mãe | 195 | 27 | 8 | 230 |
| Criança | 773 | 84 | 94 | 951 |
| Total | 968 | 111 | 102 | 1181 |

A aplicação do teste estatístico binomial para duas amostras independentes revelou que existe diferença estatística significativa entre o total de isolados de *S. mutans* e *S. sobrinus* para ambos os isolados da mãe e da criança ($p=0,0000$).

A figura 1 representa o padrão eletroforético do produto da amplificação do gene da glicosiltransferase de *S. mutans* e *S. sobrinus*, pela técnica de PCR, utilizando-se os *primers* GTFB e GTFI, respectivamente.

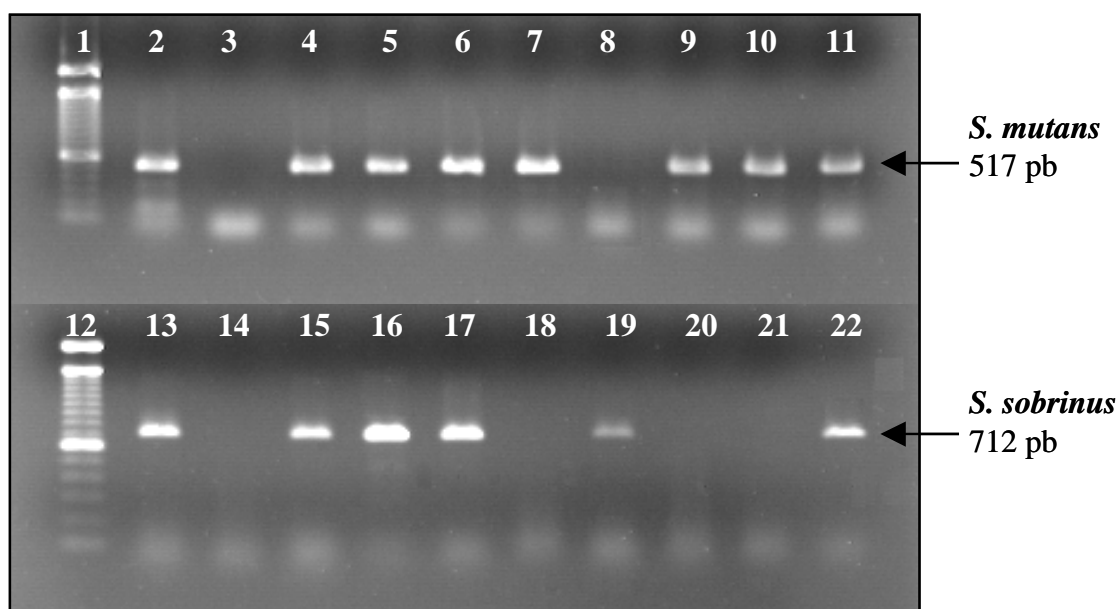


FIGURA 1: Gel de agarose com resultados de identificação. Linhas 1 e 12: padrão de peso molecular de 100 pb, Linhas 2 e 13: Controles positivos, Linhas 3 e 14: Controles negativos, Linhas 4 a 7, 9 a 11: amostras de isolados de *S. mutans*, Linhas 15 a 17, 19 e 22: amostras de isolados de *S. sobrinus*. Linha 8: isolado identificado como sendo não *S. mutans*. Linhas 18, 20 e 21: isolados identificados como sendo não *S. sobrinus*.

5.2. Genotipagem por AP-PCR:

A técnica de AP-PCR foi utilizada para analisar a diversidade genética existente entre os 968 isolados de *S. mutans* e 111 isolados de *S. sobrinus*, identificados pela técnica de PCR. A amplificação do DNA genômico destas espécies pelo *primer* OPA-02 gerou produtos de AP-PCR variando entre 2501 e 166 pb para *S. mutans* (FIGURA 2), e entre 3025 e 239 para *S. sobrinus*. O *primer* OPA-13 gerou produtos de 2230 a 260 pb para *S. mutans* (FIGURA 2) e de 2300 a 320 para *S. sobrinus*.

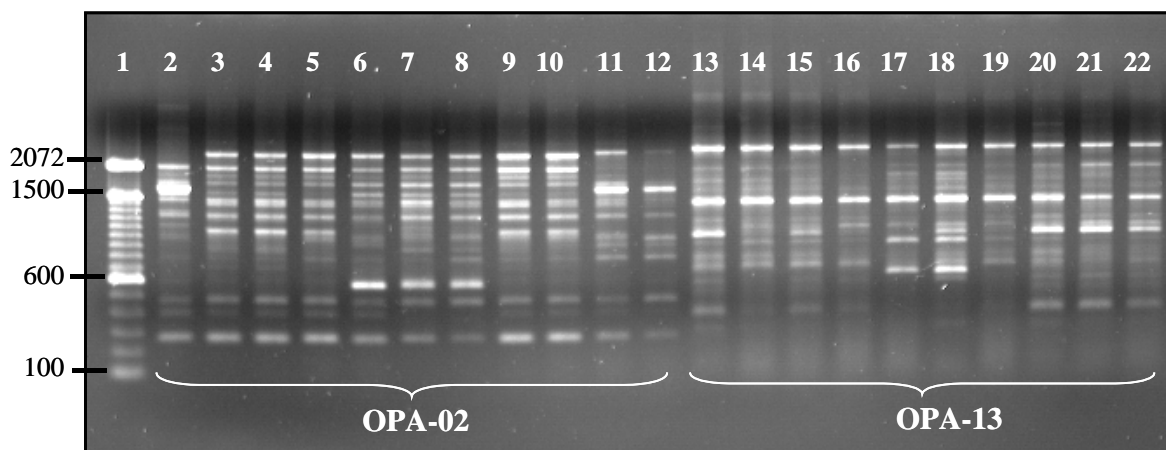


FIGURA 2: Perfis eletroforéticos de *S. mutans* isolados da cavidade bucal do par mãe-filho 8, obtidos pela técnica de A P-PCR utilizando *primers* OPA-02 (Linhas 2 a 12) e OPA-13 (Linhas 13 a 22). Linha 1: padrão de peso molecular de 100 pb; Linha 2: *S. mutans* CCT 3440; Linhas 3 a 22 isolados de *S. mutans*.

A análise dos perfis eletroforéticos, gerados pela técnica de AP-PCR através da utilização de dois *primers* arbitrários (OPA-02 e OPA-13), permitiu a construção de dendogramas (ANEXO 4) representativos dos diferentes genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* detectados para cada par mãe-filho estudados. Os diferentes genótipos foram codificados por letras maiúsculas para facilitar a leitura dos resultados em cada par mãe-filho. Iniciou-se a codificação pelos genótipos detectados nas mães com a letra A.

Com o propósito de verificar a ocorrência de transmissão vertical entre pares mãe-filho, a diversidade de genótipos no momento da aquisição inicial e durante o rastreamento epidemiológico longitudinal e a estabilidade dos genótipos adquiridos (permanência na cavidade bucal por determinado período), comparou-se os perfis eletroforéticos dos diferentes genótipos detectados nos pares mãe-filho, resultando nas tabelas gerais para dados de *S. mutans* e *S. sobrinus* (TABELA 3 e TABELA 4, respectivamente).

TABELA 3: Distribuição e número de genótipos de *S. mutans* isolados da cavidade bucal das mães e de seus respectivos filhos (no momento da aquisição inicial - primeira colheita positiva para *S. mutans* na criança; e após a aquisição inicial – adquiridos durante o acompanhamento) nos 16 pares mãe-filho(a) submetidos ao presente rastreamento epidemiológico longitudinal: subgrupos com e sem transmissão maternal.

| Grupo | Pares (n=16) (gênero / raça) | Crianças | | Mães |
|--|---------------------------------|----------------|-------------------|-------------------|
| | | Aquisição | Acompanhamento | |
| Com transmissão (n=13) | 2 [#] (F/m)** | 2 (B, C) | 2 (A, D) | 1 (A) |
| | 3 (F/b) | 3 (A, B, C) | 1 (D) | 1 (A) |
| | 4 (F/b) | 1 (A) | (A)* | 4 (A, B, C, D) |
| | 5 (F/b) | 1 (B) | 1 (A) | 2 (A, B) |
| | 7 [#] (M/b) | 1 (C) | 2 (A, D, E) | 2 (A, B) |
| | 8 (F/b) | 2 (A, B) | 3 (C, D, E) | 3 (A, B, C) |
| | 10 [#] (M/n) | 1 (C) | 2 (A, D) | 2 (A, B) |
| | 12 (M/n) | 1 (A) | 1 (E) | 4 (A, B, C, D) |
| | 13 (F/b) | 1 (A) | (A)* | 2 (A, B) |
| | 17 (F/b) | 1 (A) | - | 1 (A) |
| | 20 (F/b) | 2 (A, C) | (A, C)* | 2 (A, B) |
| | 23 (F/b) | 2 (A, B) | 4 (C, D, E, F) | 2 (A, B) |
| | 24 (M/b) | 2 (A, C) | - | 1 (A) |
| Sem transmissão (n=3) | 18 (M/m) | 4 (F, G, H, J) | 2 (I, L) | 5 (A, B, C, D, E) |
| | 28 (F/b) | 1 (C) | 5 (D, E, F, G, H) | 2 (A, B) |
| | 32 (M/m) | 1 (C) | 2 (D, E) | 2 (A, B) |
| Total de genótipos diferentes detectados | | 26 | 26 | 36 |
| Total de genótipos transmitidos | | 12 | 7 | 16 |

[#] Nos pares 2, 7 e 10 as crianças não adquiriram inicialmente genótipos provenientes de suas respectivas mães, porém os adquiriram em colheitas posteriores.

*O número de genótipos de *S. mutans* não variou em 3 crianças, que continuaram com os mesmos genótipos adquiridos inicialmente.

** A criança 2 foi a única criança que apresentou mancha branca nos incisivos superiores. Nenhuma outra criança apresentou lesão de cárie durante o acompanhamento.

- *S. mutans* não foi isolado posteriormente.

Gênero: F (feminino) e M (masculino). Raça: b (branca), m (mulata), n (negra).

As maiúsculas A, B, C, D, E, F, G, H, I e L simbolizam os diferentes genótipos detectados em cada voluntário. Sendo que as letras iguais para mãe e criança do mesmo par indicam genótipos idênticos.

TABELA 4: Distribuição e número de genótipos de *S. sobrinus* isolados da cavidade bucal das mães e de seus respectivos filhos (no momento da aquisição inicial - primeira colheita positiva para *S. sobrinus* na criança; e após a aquisição inicial – adquiridos durante o acompanhamento) nos 16 pares mãe-filho submetidos ao presente rastreamento epidemiológico longitudinal: subgrupos com e sem transmissão maternal.

| Grupo | Pares (n=16) (gênero / raça) | Crianças | | Mães |
|--|---------------------------------|-----------|----------------|------------|
| | | Aquisição | Acompanhamento | |
| Com transmissão (n=5) | 4 (F/b) | 1 (A) | (A)* | 1 (A) |
| | 7 (M/b) | 1 (A) | 2 (B, C) | 1 (A) |
| | 17 (F/b) | 1 (A) | - | 1 (A) |
| | 20 (F/b) | 1 (A) | 1 (B) | 1 (A) |
| | 28 (F/b) | 1 (A) | - | 1 (A) |
| Sem transmissão (n=11) | 2 (F/m) ** | 1 (D) | 1 (E) | 3 (A, B,C) |
| | 3 (F/b) | 1 (A) | (A)* | - |
| | 5 (F/b) | - | - | - |
| | 8 (F/b) | 1 (A) | - | - |
| | 10 (M/n) | 1 (A) | (A)* | - |
| | 12 (M/n) | 1 (A) | - | - |
| | 13 (F/b) | - | - | - |
| | 18 (M/m) | 1 (A) | - | - |
| | 23 (F/b) | 1 (A) | - | - |
| | 24 (M/b) | - | - | - |
| | 32 (M/m) | - | - | - |
| Total de genótipos diferentes detectados nas crianças | | 12 | 4 | 8 |
| Total de genótipos transmitidos | | 5 | 0 | 5 |

* O número de genótipos de *S. sobrinus* não variou em 3 crianças, que continuaram com os mesmos genótipos adquiridos inicialmente.

** A criança 2 foi a única criança que apresentou mancha branca nos incisivos superiores. Nenhuma outra criança apresentou lesão de cárie durante o acompanhamento.

- *S. sobrinus* não foi isolado posteriormente.

Gênero: F (feminino) e M (masculino). Raça: b (branca), m (mulata), n (negra).

As maiúsculas A, B, C, D e E simbolizam os diferentes genótipos detectados em cada voluntário. Sendo que as letras iguais para mãe e criança do mesmo par indicam genótipos idênticos.

5.2.1. Transmissão de *S. mutans* e de *S. sobrinus*:

A análise dos genótipos de *S. mutans* encontrados nos pares mãe-filho permitiu a construção da TABELA 5 que ilustra a ocorrência ou não de transmissão vertical.

TABELA 5: Ocorrência de transmissão vertical de *S. mutans* nos 16 pares mãe-filho durante o acompanhamento:

| <i>Transmissão</i> | <i>Pares</i> | <i>Total</i> |
|--------------------|---|--------------------------|
| Sim | 2*, 3, 4, 5, 7*, 8#, 10*, 12, 13, 17, 20, 23#, 24 | 13 (81,25%) ^A |
| Não | 18, 28, 32 | 3 (18,75%) ^B |

* Nos pares 2, 7 e 10 as crianças não adquiriram inicialmente genótipos provenientes de suas respectivas mães, porém os adquiriram em colheitas posteriores.

Nos pares 8 e 23 ocorreu transmissão de 2 genótipos das mães para suas respectivas crianças.

Ocorreu transmissão maternal (vertical) de 1 a 2 genótipos de *S. mutans*, no momento da aquisição inicial ou durante o período de acompanhamento, em 13 dos 16 pares mãe-filho avaliados neste estudo. No momento da aquisição inicial de *S. mutans* pelas crianças, 10 das 16 crianças adquiriram genótipos provenientes da mãe (8 crianças adquiriram apenas 1 genótipo da mãe e 2 crianças adquiriram 2 genótipos). Durante o rastreamento epidemiológico longitudinal apenas 3 crianças (2, 7 e 10) que não haviam adquirido inicialmente genótipos de *S. mutans* similares aos de suas mães, os adquiriram posteriormente. Entre as crianças que já haviam adquirido inicialmente genótipos provenientes da mãe, a criança 8 que já adquirira 2 genótipos (A e B) adquiriu posteriormente outro genótipo (C) de sua mãe; e a criança 5 que possuía 1 genótipo (B) proveniente de sua mãe adquiriu posteriormente outro genótipo (A) detectado na mesma.

A aplicação do teste estatístico binomial para duas amostras independentes revelou que existe diferença estatística significativa entre o número de crianças que adquiriram *S. mutans* das mães comparadas as que não adquiriram ($p=0,0004$).

A análise dos genótipos de *S. sobrinus* encontrados nos pares mãe-filho permitiu a construção da TABELA 6 que ilustra a ocorrência ou não de transmissão maternal.

TABELA 6: Ocorrência de transmissão vertical de *S. sobrinus* nos 16 pares mãe-filho submetidos ao presente rastreamento epidemiológico longitudinal:

| <i>Transmissão</i> | <i>Pares</i> | <i>Total</i> |
|--------------------|--|--------------------------|
| Sim | 4, 7, 17, 20, 28 | 5 (31,25%) ^A |
| Não | 2, 3, 5, 8, 10, 12, 13, 18, 23, 24, 32 | 11 (68,75%) ^B |

Na aquisição inicial de *S. sobrinus* ocorreu transmissão maternal (vertical) de apenas 1 genótipo, no momento da aquisição inicial ou durante o período de acompanhamento, em 5 dos 16 pares mãe-filho avaliados neste estudo. A aplicação do teste estatístico binomial para duas amostras independentes revelou que existe diferença estatística significativa entre o número de crianças que adquiriram *S. sobrinus* das mães comparadas as que não adquiriram ($p=0,0131$). Seis crianças apresentaram-se colonizadas por 1 genótipo distinto de *S. sobrinus*, porém nenhum isolado de *S. sobrinus* foi obtido das mães dessas crianças.

Observou-se a ocorrência de transmissão vertical de ambos *S. mutans* e *S. sobrinus* em apenas 4 pares (4, 7, 17 e 20) dos 16 pares mãe-filho estudados (25%). O Teste

binomial para duas proporções mostrou ser significativamente menor a ocorrência de transmissão de ambas as espécies ($p=0,0047$). Ainda, dos 3 pares em que não ocorreu transmissão maternal de *S. mutans* (pares 18, 28 e 32), no par 28 ocorreu transmissão de apenas *S. sobrinus* e nos pares 18 e 32 não ocorreu transmissão de ambas as espécies avaliadas.

A observação dos dados das TABELAS 5 e 6 permitiu a construção do gráfico de ocorrência de transmissão vertical no pares mãe-filho para *S. mutans* (S.m.), *S. sobrinus* (S.s.) e ambas as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* (S.m. e S.s.), representado na FIGURA 3.

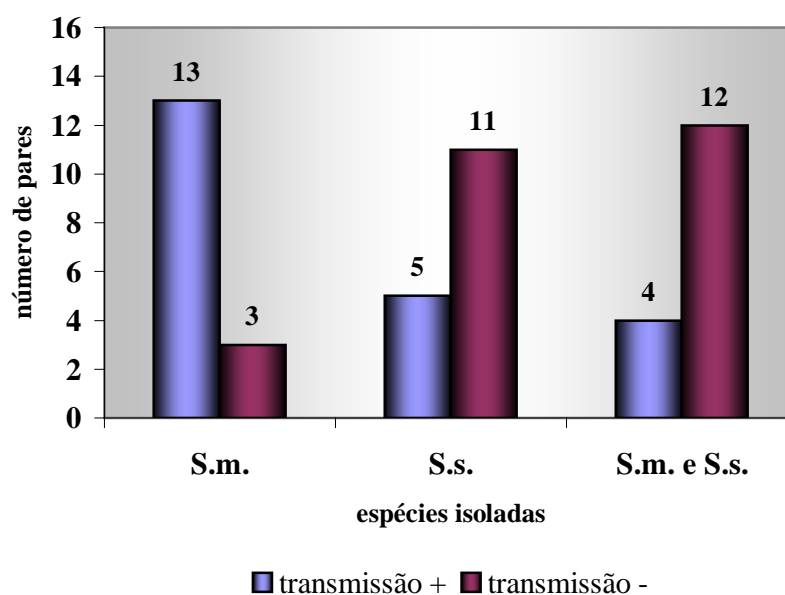


FIGURA 3: Gráfico da ocorrência de transmissão vertical de *S. mutans*, *S. sobrinus*, e ambos *S. mutans* e *S. sobrinus*.

O gráfico ilustrado na FIGURA 3 exibe o número de pares em que ocorreu transmissão (transmissão +) e o os pares em que não ocorreu transmissão (transmissão -), com diferenças estatísticas significativas no sucesso de transmissão para *S. mutans* e *S.*

sobrinus ($p=0,0004$ e $p=0,0131$, respectivamente) verificadas através da realização do teste binomial para duas proporções. O número de pares em que ocorreu transmissão de ambas as espécies também se mostrou significativamente menor em relação ao número de pares em que não ocorreu tal transmissão ($p=0,0047$). O tratamento dos dados presentes no gráfico, pelo teste exato de Fisher, mostrou que a maior proporção de pares em que ocorreu transmissão de *S. mutans* em relação à transmissão de *S. sobrinus* é estatisticamente significativa ($p=0,0113$). Isto se deve ao fato de que *S. sobrinus* não foi isolado em 10 das 16 mães avaliadas.

Em adição, o pequeno tamanho da amostra adicionado à proporção desigual entre meninas ($n=11$) e meninos ($n=5$) e no número de crianças brancas ($n=11$), mulatas ($n=3$) e negras ($n=2$), não permitiu a realização de correlação entre gênero e raça com fidelidade de transmissão maternal.

Após a observação de que alguns genótipos detectados nas crianças eram diferentes daqueles detectados em suas respectivas mães, verificou-se a possível ocorrência de transmissão horizontal entre as crianças que compartilham o mesmo ambiente (sala) em 4 creches municipais. Para tanto, comparou-se o perfil eletroforético obtido através da utilização de 2 primers arbitrários (OPA-02 e OPA-13) dos diferentes genótipos detectado nas crianças – 4 e 5; 2, 3 e 7; 12 e 13; 24, 28 e 32 - para a construção de dendogramas de similaridade (FIGURAS 4, 5, 6 e 7). Utilizou-se uma codificação dos genótipos provenientes de cada criança com o número da criança seguida pela letra correspondente ao genótipo encontrado no par mãe-filho da mesma (por exemplo: criança 2 genótipo A – 2A). Nenhuma das crianças, que compartilham o mesmo ambiente, apresentaram genótipos de *S. mutans* idênticos (cada criança apresentava genótipos distintos das outras crianças).

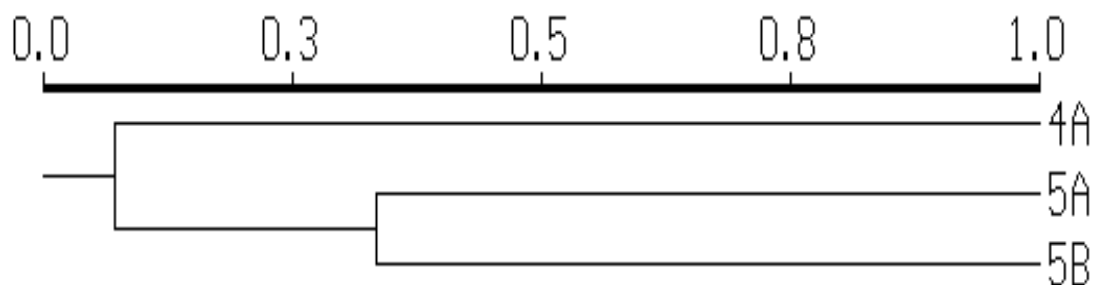


FIGURA 4: Dendrograma representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados nas crianças 4 e 5, que compartilhavam o mesmo ambiente na creche municipal.

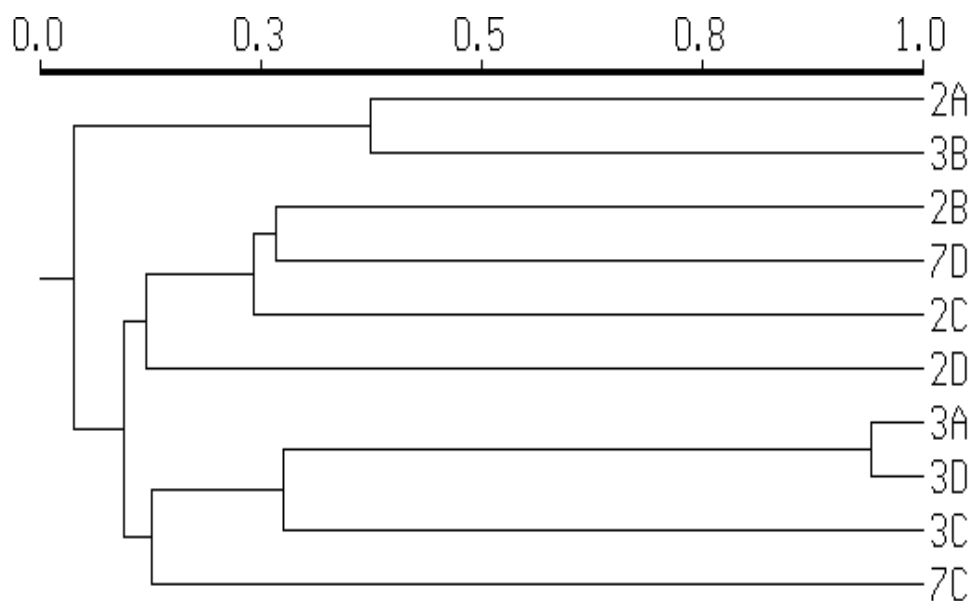


FIGURA 5: Dendrograma representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados, durante o acompanhamento longitudinal, nas crianças 2, 3 e 7, que compartilhavam o mesmo ambiente na creche municipal.

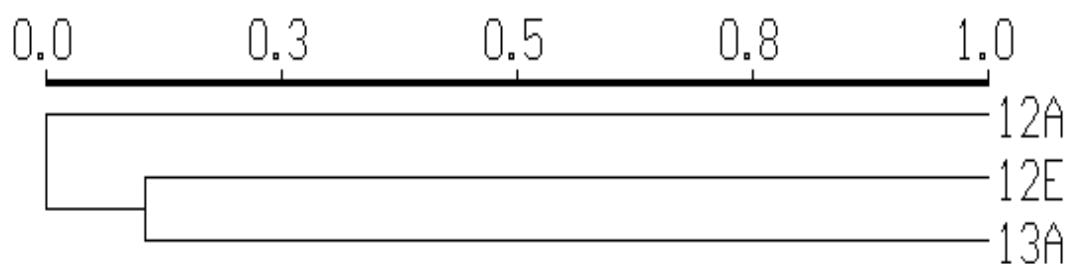


FIGURA 6: Dendograma representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados nas crianças 12 e 13, que compartilhavam o mesmo ambiente na creche municipal.

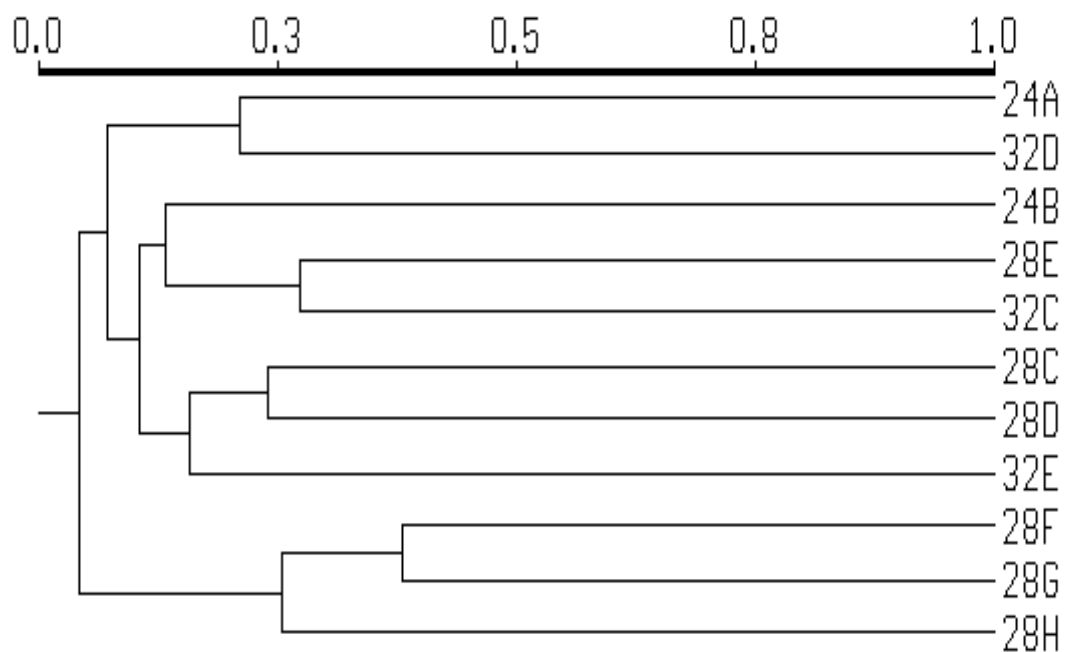


FIGURA 7: Dendograma representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados nas crianças 24, 28 e 32, que compartilhavam o mesmo ambiente na creche municipal.

A observação dos dendogramas ilustrados nas FIGURAS 4, 5, 6 e 7 permite verificar as distâncias genéticas dos diferentes genótipos detectados em cada criança. O padrão de similaridade entre os diferentes genótipos detectados nas crianças, que compartilhavam o mesmo ambiente na creche, foi muito baixo, sendo menor de 50% na maioria dos casos.

5.2.2. Diversidade de *S. mutans* e de *S. sobrinus*:

A TABELA 3 nos mostra o número de genótipos de *S. mutans* encontrados no momento da aquisição e durante o rastreamento epidemiológico longitudinal. Foram detectados de 1 a 4 genótipos no momento da aquisição, sendo que apenas 1 criança (18) apresentou 4 genótipos não adquiridos de sua mãe. A maioria das crianças (n=9) adquiriu inicialmente apenas 1 genótipo de *S. mutans*, 5 crianças adquiriram 2 genótipos e 1 criança adquiriu 3 genótipos. Dentre o total de 773 *S. mutans* isolados da cavidade bucal das crianças (n=16) encontrou-se 52 genótipos diferentes (26 genótipos no momento da aquisição inicial – primeira colheita que se mostrou positiva para *S. mutans* – e 26 genótipos adquiridos nas colheitas posteriores).

Dentre o total de 195 *S. mutans* isolados da cavidade bucal das mães encontrou-se 36 genótipos diferentes.

A TABELA 4 nos mostra o número de genótipos de *S. sobrinus* encontrados no momento da aquisição e durante o rastreamento epidemiológico longitudinal. Foi detectado apenas 1 genótipo no momento da aquisição de *S. sobrinus* pelas crianças. Dentre o total de 85 *S. sobrinus* isolados da cavidade bucal das crianças (n=12) encontrou-se 16 genótipos diferentes. Destes, 12 genótipos foram detectados no momento da aquisição inicial (12

crianças), na primeira colheita que se mostrou positiva para *S. sobrinus*, e 4 genótipos foram adquiridos em colheitas posteriores (3 crianças). Durante o período avaliado, apenas a criança 7 mostrou-se colonizada por 3 genótipos (na aquisição inicial, por 1 genótipo e em colheita posterior, por 2 genótipos distintos entre si e diferente daquele adquirido inicialmente); e 2 crianças (2 e 20) colonizadas por 2 genótipos - na aquisição inicial, por 1 genótipo e em colheita posterior, por outro genótipo diferente daquele adquirido inicialmente.

Dentre o total de 26 *S. sobrinus* isolados da cavidade bucal das mães (n=6) encontrou-se 8 genótipos diferentes.

Os dados apresentados na TABELA 7 mostram o total de isolados e genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* detectados nas 16 crianças e suas mães avaliadas neste estudo.

TABELA 7: Total de isolados e de genótipos de *S. mutans* e de *S. sobrinus* detectados nas crianças e nas mães:

| | <i>S. mutans</i> | | <i>S. sobrinus</i> | |
|-----------|------------------|---------|--------------------|---------|
| | mãe | criança | mãe | criança |
| Isolados | 195 | 773 | 26 | 84 |
| Genótipos | 36 | 52 | 8 | 16 |

A análise da frequência de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus*, detectados na mãe e/ou na criança, e sua relação com a quantidade de isolados de *S. mutans* e *S. sobrinus*, na mãe e/ou na criança, foi analisada pelo Coeficiente de Correlação de Spearman (ANEXO 5). Os resultados obtidos não mostram associação significativa entre o número de genótipos

de *S. mutans* detectados e o número de isolados ($p=0,0778$). Ao contrário, para *S. sobrinus* houve correlação positiva entre o número de genótipos detectados e o número de isolados ($p=0,0126$).

A TABELA 8 ilustra a diversidade genotípica de *S. mutans* em relação aos sítios de coleta e número de isolados por sítios nas 16 crianças estudadas.

TABELA 8: Diversidade genotípica *S. mutans* x sítios de coleta x número de isolados nas 16 crianças estudadas:

| Sítio* | Genótipos detectados (%) [#] | Total de isolados testados [@] |
|--------|---------------------------------------|---|
| S | 29 (55,77%) | 194 (25,09%) |
| L | 25 (48,07%) | 165 (21,34%) |
| G | 24 (46,15%) | 142 (18,37%) |
| D | 35 (67,30%) | 272 (35,19%) |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[#] Em relação ao total de 52 genótipos diferentes de *S. mutans* detectados nas 16 crianças.

[@] O número total de isolados de *S. mutans* nas crianças foi 773.

Através do teste estatístico do Qui-Quadrado analisou-se o número de diferentes genótipos detectados em cada sítio (saliva-S, dorso de língua-L, rodete gengival-G, placa dental-D) confrontando-se dois sítios distintos e os respectivos números de diferentes genótipos detectados. Verificou-se que a placa dental, o sítio com maior número de genótipos detectados, apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao rodete gengival, sítio com menor número de genótipos diferentes detectados ($p=0,0478$). Entretanto, confrontando-se os demais sítios – S x D, L x D, S x L, S x G, e L x G – não ocorreu diferença estatística significativa ($p>0,05$).

Utilizando-se o mesmo teste estatístico, analisou-se o número de isolados encontrados em cada um dos quatro sítios confrontando dois sítios distintos com os seus respectivos números de isolados totais. Observou-se que se confrontando o sítio com maior número de isolados (placa dental) e os demais sítios (saliva, dorso de língua, rodete gengival) ocorreu diferença estatística significativa, sendo $p=0,0000$ para as três comparações (D x S, D x L, D x G). Ainda, ocorreu diferença estatística significativa entre o número de isolados da saliva e do rodete gengival ($p=0,0017$). Para as comparações S x L e L x G não se observou diferença estatística significativa ($p>0,05$).

A TABELA 9 ilustra a diversidade genotípica de *S. sobrinus* em relação aos sítios de coleta e número de isolados por sítios em 12 das 16 crianças estudadas.

TABELA 9: Diversidade genotípica *S. sobrinus* x sítios de coleta x número de isolados em 12 das 16 crianças estudadas:

| Sítio* | Genótipos detectados (%) [#] | Total de isolados testados [@] |
|--------|---------------------------------------|---|
| S | 6 (37,5%) | 11 (13,10%) |
| L | 8 (50%) | 17 (20,24%) |
| G | 5 (31,25%) | 6 (7,14%) |
| D | 10 (62,5%) | 50 (59,52%) |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[#] Em relação ao total de 16 genótipos diferentes de *S. sobrinus* detectados nas 12 crianças.

[@] O número total de isolados de *S. sobrinus* nas crianças foi 84.

O tratamento dos dados presentes na TABELA 9 com o teste estatístico do Qui-Quadrado confrontando-se dois sítios distintos e os respectivos números de diferentes

genótipos detectados (D x S, D x L, D x G, S x L, S x G, e L x G), revelou não haver diferença estatística significativa ($p>0,05$). Embora, a placa dental tenha sido o sítio com maior número de genótipos diferentes detectados. Utilizando-se o mesmo teste estatístico, analisou-se o número de isolados encontrados em cada um dos quatro sítios confrontando dois sítios distintos com os seus respectivos números de isolados totais. Observou-se que se confrontando o sítio com maior número de isolados (placa dental) e os demais sítios (saliva, dorso de língua, rodete gengival) ocorreu diferença estatística significativa, sendo $p=0,0000$ para as três comparações (D x S, D x L, D x G). Para as comparações S x L, S x G e L x G não se observou diferença estatística significativa ($p>0,05$).

A placa dental mostrou-se um sítio importante, com maior número de genótipos diferentes (35 de 52 para *S. mutans* e 10 de 16 para *S. sobrinus*) e maior número de isolados, porém, não foi representativa de todos os genótipos detectados nas crianças. Portanto, a colheita de material de mais sítios da cavidade bucal pode fornecer uma microbiota mais representativa.

A FIGURA 8 ilustra a diversidade de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* detectados na placa dental em relação ao número de dentes presentes na cavidade bucal das 16 crianças. Ressalta-se que a média de dentes irrompidos no momento da aquisição inicial foi 9,125, onde o menor e o maior número de dentes irrompidos eram 4 e 16 (mediana=9,5).

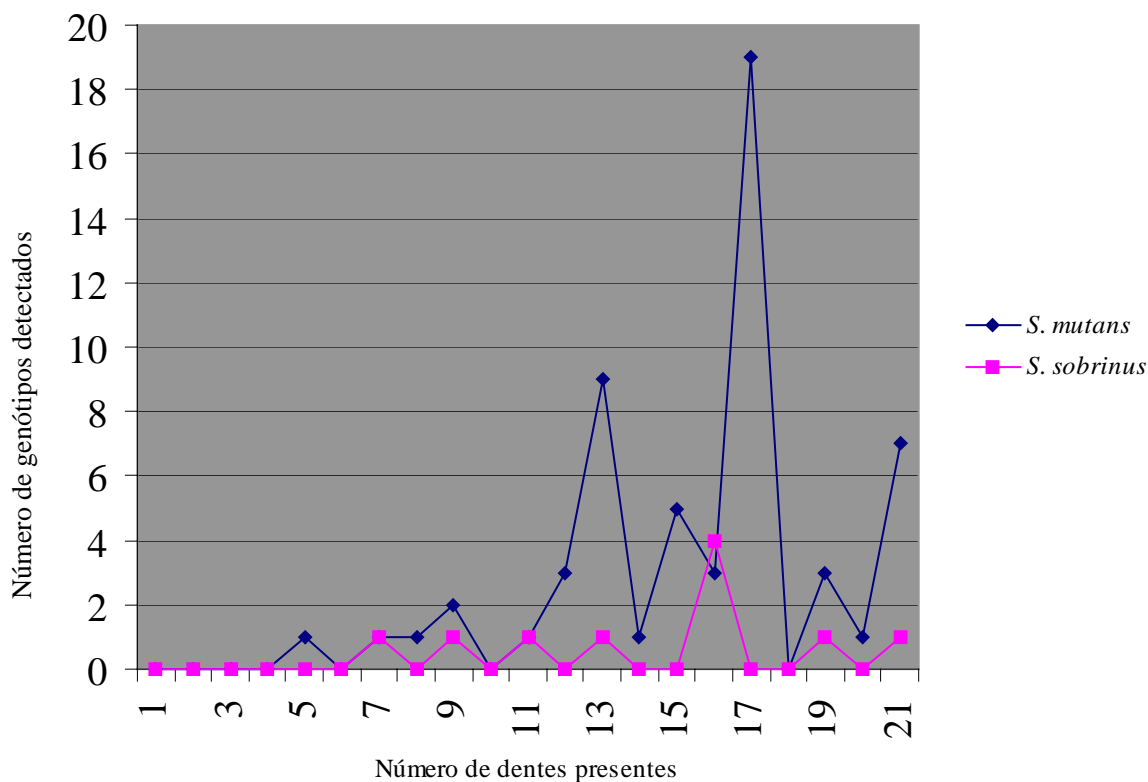


FIGURA 8: Gráfico do número de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* detectados na placa dental em função do número de dentes presentes nas crianças.

A FIGURA 9 ilustra a diversidade de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* detectados em relação à idade em meses das 16 crianças. Ressalta-se que a média de idade no momento da aquisição inicial (primeira colheita que se mostrou positiva para *S. mutans* e/ou *S. sobrinus*) foi 15,8 meses; e que o período médio do rastreamento epidemiológico longitudinal foi de 19,2 meses, sendo que menor o e maior período de acompanhamento foram 14,8 e 24,7 meses, respectivamente. Os dados de diversidade dos genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* detectados em relação à idade em meses de cada uma das 16 crianças avaliadas estão presentes nos gráficos do ANEXO 6.

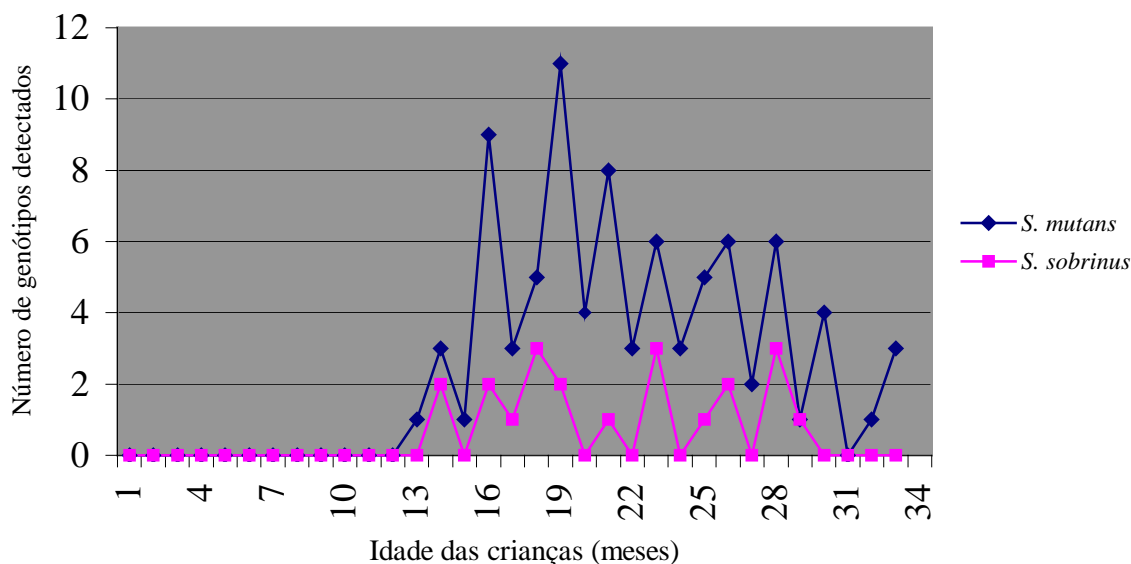


FIGURA 9: Gráfico do número de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* detectados em função da idade das crianças.

5.2.3. Estabilidade de genótipos de *S. mutans* e de *S. sobrinus*:

A TABELA 10 ilustra os dados de estabilidade de genótipos de *S. mutans* detectados nas 16 crianças acompanhadas neste estudo.

Dos 8 genótipos de *S. mutans* diferentes com estabilidade efetiva, em 7 crianças, 4 não foram adquiridos da mãe. Entretanto, observou-se que os genótipos de *S. mutans* com estabilidade efetiva transmitidos pela mãe permaneceram colonizando a cavidade bucal das crianças por um período maior (7,18 meses em média), contrastando com os genótipos não transmitidos pela mãe (2,87 meses em média). Ressalta-se que a criança 13, colonizada por um único genótipo, transmitido por sua mãe, foi a criança em que a estabilidade efetiva foi maior, sendo de 11,5 meses.

TABELA 10: Estabilidade de genótipos de *S. mutans* detectados nas 16 crianças envolvidas no rastreamento epidemiológico longitudinal, divididas em 3 subgrupos: estabilidade efetiva, estabilidade transitória e sem estabilidade.

| Grupo | Crianças (n=16) | Colheitas (meses) ^γ | Genótipos | |
|---|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | | Com transmissão vertical | Sem transmissão vertical |
| Estabilidade efetiva* (n= 7) | 2 | 7 a 10 (6,8) | A | - |
| | 3 [#] | 8 a 10 (4,2) | - | B |
| | 4 | 9 a 10 (1,7) | A | - |
| | 8 [#] | 6 a 10 (8,7) | B | - |
| | 13 | 4 a 9 (11,5) | A [@] | - |
| | 23 | 6 a 7 (2,1) | - | D |
| | 32 | 5 a 6 (2,3) | - | C, E |
| Estabilidade transitória** (n= 3) | 3 [#] | 4 a 5 (3,5) | A | - |
| | 8 [#] | 4 a 6 (5,1) | A | - |
| | 10 | 7 a 8 (1,76) | A | - |
| Sem estabilidade*** (n= 8) | 5 | - | - | - |
| | 7 | - | - | - |
| | 12 | - | - | - |
| | 17 | - | - | - |
| | 18 | - | - | - |
| | 20 | - | - | - |
| | 24 | - | - | - |
| | 28 | - | - | - |

* Estabilidade efetiva: as crianças mostraram-se colonizadas por genótipos idênticos de *S. mutans* em colheitas consecutivas até o final do acompanhamento realizado.

** Estabilidade transitória: as crianças mostraram-se colonizadas por genótipos idênticos de *S. mutans* em colheitas consecutivas, porém os mesmos não foram detectados em colheitas posteriores.

*** Sem estabilidade: as crianças mostraram-se colonizadas por genótipos idênticos de *S. mutans* em colheitas não consecutivas (alternadas), ou os genótipos detectados eram diferentes nas diversas colheitas realizadas.

[#] Crianças 3 e 8 apresentaram tanto estabilidade transitória quanto efetiva durante o período de avaliação.

[@] Único genótipo detectado na criança 13.

^γ Corresponde ao período, em meses, de permanência de determinado genótipo na cavidade bucal das crianças.

Nas 3 crianças em que os genótipos de *S. mutans* apresentaram estabilidade transitória os mesmos permaneceram por 3,5, 5,1 e 1,76 meses, respectivamente, nas crianças 3, 8 e 10.

A TABELA 11 relaciona a estabilidade efetiva de genótipos *S. mutans*, os sítios em que foram detectados os genótipos e o número de isolados em cada sítio em 7 crianças das 16 crianças estudadas (crianças 2, 3, 4, 8, 13, 23 e 32).

TABELA 11: Diversidade de genótipos *S. mutans* com estabilidade efetiva x sítios de coleta x número de isolados em 7 das 16 crianças estudadas:

| Sítio* | Genótipos detectados (%) [#] | Total de isolados estáveis [@] |
|--------|---------------------------------------|---|
| S | 8 (100%) | 100 (25,78%) |
| L | 7 (87,5%) | 99 (25,51%) |
| G | 7 (87,5%) | 81 (20,88%) |
| D | 8 (100%) | 108 (27,83%) |

* Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[#] Em relação ao total de 8 genótipos diferentes de *S. mutans* detectados com estabilidade efetiva em 7 crianças.

[@] O número total de isolados de *S. mutans* com estabilidade efetiva nas 7 crianças foi 388.

Através do teste estatístico do Qui-Quadrado analisou-se o número de diferentes genótipos de *S. mutans*, com estabilidade efetiva, detectados em cada sítio (saliva-S, dorso de língua-L, rodete gengival-G, placa dental-D) confrontando-se dois sítios distintos e os respectivos números de diferentes genótipos detectados (D x S, D x G, D x L, S x L, S x G, e L x G), verificou-se que não ocorreu diferença estatística significativa em nenhum caso ($p>0,05$).

Utilizando-se o mesmo teste estatístico, analisou-se o número de isolados encontrados em cada um dos quatro sítios confrontando dois sítios distintos com os seus respectivos números de isolados totais. Observou-se que ocorreu diferença estatística significativa apenas para D x G (o sítio com maior número de isolados *versus* o sítio com menor número de isolados), $p=0,0297$. Para as demais comparações (D x S, D x L, S x L, S x G, e L x G) não se observou diferença estatística significativa ($p>0,05$).

A TABELA 12 ilustra os dados de estabilidade de genótipos de *S. sobrinus* detectados em 12 das 16 crianças acompanhadas neste estudo. Para os genótipos de *S. sobrinus* não ocorreu estabilidade efetiva em nenhuma das 12 crianças colonizadas por *S. sobrinus*. Apenas 2 crianças, 7 e 20, colonizadas por genótipos *S. sobrinus* apresentaram estabilidade transitória por 4,8 e 2,3 meses. Em 10 das 12 crianças colonizadas por *S. sobrinus* não houve estabilidade dos genótipos de *S. sobrinus*, pois nestas crianças em, pelo menos uma colheita, detectou-se a presença de *S. sobrinus*.

TABELA 12: Estabilidade de genótipos de *S. sobrinus* detectados no subgrupo de 12[#] em que *S. sobrinus* foram detectados durante o estudo, dividido em 2 subgrupos: estabilidade transitória e sem estabilidade.

| Grupo | Crianças (n=12) | Colheitas (meses) | Genótipos | |
|-------------------------------|--------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | | Com transmissão vertical | Sem transmissão vertical |
| Estabilidade transitória* | 7 | 6 a 7 (4,8) | A | - |
| (n= 2) | 20 | 5 a 6 (2,3) | A | - |
| Sem estabilidade** (n= 10) | 2 | - | - | - |
| | 3 | - | - | - |
| | 4 | - | - | - |
| | 8 | - | - | - |
| | 10 | - | - | - |
| | 12 | - | - | - |
| | 17 | - | - | - |
| | 18 | - | - | - |
| | 23 | - | - | - |
| | 28 | - | - | - |

* Estabilidade transitória: as crianças mostraram-se colonizadas por genótipos idênticos de *S. mutans* em colheitas consecutivas, porém os mesmos não foram detectados em colheitas posteriores.

** Sem estabilidade: as crianças mostraram-se colonizadas por genótipos idênticos de *S. mutans* em colheitas não consecutivas (alternadas), ou os genótipos detectados eram diferentes nas diversas colheitas realizadas.

[#] Nas crianças 5, 13, 24 e 32 não foram isolados *S. sobrinus* em nenhuma colheita.

6. DISCUSSÃO

Os resultados de isolamento e identificação dos estreptococo grupo mutans mostram que *S. mutans* foi mais prevalente em relação ao *S. sobrinus*, isto independente do sítio de isolamento e voluntário estudados. Estes dados estão de acordo com o que a literatura tem relatado (LOESCHE, 1986; CARLSSON *et al.*, 1987; van PALENSTEIN HELDERMAN, 1983; NAPIMOGA *et al.*, 2001; MATOS NASCIMENTO *et al.*, 2001; STIPP *et al.*, 2002). A técnica de PCR foi selecionada para identificação dos isolados em virtude de sua efetividade e rapidez em relação aos métodos tradicionais de identificação bioquímica. Ainda, estudos conduzidos neste laboratório, comparando PCR e testes bioquímicos para identificação, mostraram não haver diferença estatística significativa entre os métodos (STIPP *et al.*, 2001; MATOS NASCIMENTO, 2002).

Pela técnica de PCR, não foi possível identificar 102 dos 1181 isolados (8,65%) nem como sendo *S. mutans* e/ou *S. sobrinus*, provavelmente estes isolados sejam algum dos outros estreptococos do grupo mutans para os quais não foram utilizado *primers* específicos. Esta taxa de isolamento de estreptococos grupo mutans não *S. mutans* e não *S. sobrinus* corrobora com resultados prévios, onde a identificação bioquímica foi utilizada, e a taxa de tais microrganismos variou entre 13% e 17% (MATTE *et al.*, 1992; DASANAYAKE *et al.*, 1995; NAPIMOGA *et al.*, 2001; MATOS NASCIMENTO *et al.*, 2001), o que demonstra que ambas as técnicas permitem a identificação da grande maioria dos isolados. Ressaltam-se, ainda, as diferenças existentes principalmente em relação à idade das populações estudadas e que em estudos avaliando população infantil geralmente não fazem discriminação entre *S. mutans* e *S. sobrinus*, tratando-os de forma generalizada

como estreptococos grupo mutans (LI & CAUFIELD, 1995; KOZAI *et al.*, 1999; REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2000; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b).

A técnica de AP-PCR mostrou-se um recurso importante para a genotipagem dos isolados, obtendo-se 100% de aproveitamento na análise das amostras. Isto está de acordo com vários trabalhos publicados anteriormente (SAARELA *et al.*, 1996; ALALUUSUA *et al.*, 1996; LI & CAUFIELD, 1998; SPOLIDÓRIO *et al.*, 2001; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b; MATOS NASCIMENTO *et al.*, 2002). Os perfis genéticos obtidos, pelos dois *primers* arbitrários (OPA-02 e OPA-13), foram convertidos em dendogramas de similaridade entre os diferentes isolados em cada par mãe-filho. Tais dendogramas forneceram os dados sobre transmissão, diversidade e estabilidade de diferentes genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* detectados nos voluntários deste estudo.

Verificou-se a ocorrência de transmissão vertical maternal de genótipos de *S. mutans* em 13 dos 16 pares avaliados (81,25%). Esta proporção foi maior do que a relatada pela literatura, que traz uma variação entre 24 e 71% de coincidência de genótipos de estreptococos grupo mutans em pares mãe-filho (KULKARNI *et al.*, 1989; CAUFIELD & WALKER, 1989; LI & CAUFIELD, 1995; ALALUUSUA *et al.*, 1996; KOZAI *et al.*, 1999; REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2000). Possivelmente, estas contradições refletem variações culturais e comportamentais relacionadas ao tipo e intensidade de contatos salivares entre mães e filhos. Ainda, pode estar associado a variações na suscetibilidade individual das crianças, incluindo o período denominado “janela de infectividade”, erupção dos molares, a ação de fatores salivares inespecíficos e do sistema imunológico de mucosas (CAUFIELD, 1997).

A metodologia e o protocolo aplicados neste estudo longitudinal, com colheitas a cada 2 meses, de vários sítios da cavidade bucal envolvidos, o que em teoria pode fornecer dados mais precisos sobre a real dinâmica de colonização destas crianças, diferem consideravelmente dos estudos realizados anteriormente, em que geralmente foram coletadas apenas amostras de saliva e de placa dental e as colheitas efetuadas em uma única ocasião (ALALUUSUA *et al.*, 1996; REDMO EMANUELSSON & WANG, 1998; REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998; KOZAI *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2000) ou em dois momentos distintos (KULKARNI *et al.*, 1989; CAUFIELD & WALKER., 1989). O único estudo com diversas colheitas realizadas durante 3 anos de acompanhamento, com intervalos de 3 meses foi realizado por LI & CAUFIELD, em 1995.

Poucos dados estão disponíveis na literatura a respeito da colonização, diversidade e vias de transmissão de *S. sobrinus*. No presente estudo ocorreu transmissão em apenas 5 dos 16 pares analisados (31,25%), enquanto que num estudo realizado com famílias chinesas por KOZAI *et al.* (1999), verificou-se a transmissão de *S. sobrinus* em 10 das 20 famílias avaliadas (50%), havendo a transmissão de mãe-filho em 4 famílias, de pai-filho em 5 famílias, apenas em uma família houve transmissão de *S. sobrinus* de ambos pai e mãe para filho. A idade das crianças que adquiriram *S. sobrinus* de seus pais, no estudo com famílias chinesas, variou de 0 a 12 anos, sendo em média 3,45 anos, sendo portanto, uma faixa etária superior àquela apresentada pelas crianças deste estudo (15,8 meses). Tais dados permitem considerar que a diferença de faixa etária descrita para a amostragem pode ser um fator limitante quando se deseja comparar resultados de mesma natureza, já que a dinâmica de colonização destas crianças pode envolver características próprias. Fatores

outros como características culturais entre as populações analisadas e aspectos da metodologia empregada ampliam ainda mais a obtenção de dados discrepantes.

Ressalta-se, também, que embora *S. sobrinus* seja relatado juntamente com *S. mutans* na iniciação e progressão da cárie dental, o estudo de BECKER *et al.* (2002), utilizando sonda de 16S para a análise de microrganismos não cultiváveis, detectou *S. sobrinus* em 9 das 30 crianças com cárie rampante (30%), proporção menor do que aquela obtida para *S. mutans*. Portanto, a maior proporção de pares em que ocorreu transmissão de *S. mutans* em relação à transmissão de *S. sobrinus*, pode ser devido à frequência de isolamento/detecção de *S. sobrinus* ter sido menor, pois *S. sobrinus* não foi isolado em 10 mães (62,5%), devendo-se considerar uma possível subestimação na proporção encontrada neste estudo.

Entretanto, comparando-se estes dados com aqueles obtidos por REDMO EMANUELSSON *et al.* (1998) em que apenas 1 mãe e 4 pais de 11 famílias avaliadas albergavam *S. sobrinus*, verifica-se que *S. sobrinus* também foi encontrado em menor proporção do que *S. mutans*, indicando uma proporcionalidade do binômio frequência de isolamento-transmissibilidade. Logo, alguns genótipos presentes na mãe podem não ter sido detectados nas suas crianças, ou vice-versa, por estarem presentes em níveis abaixo do limite de detecção da técnica por cultura (REDMO EMANUELSSON & THORNQVIST, 2000).

A proporção entre meninas (n=11) e meninos (n=5) e no número de crianças brancas (n=11), mulatas (n=3) e negras (n=2), foi desigual neste estudo devido ao número da amostra ser pequeno, limitando a possibilidade de correlacionar gênero e raça com fidelidade de transmissão maternal, conforme sugerido por LI & CAUFIELD (1995). Esses

autores mostraram que ocorrência de transmissão, em famílias americanas, de genótipos de estreptococos grupo mutans de mãe para filhas foi maior do que de mãe para filhos, sendo a taxa de 88 e 53%, respectivamente. Ainda, os genótipos detectados nas meninas mostravam concordância com os genótipos detectados nas suas mães 6 vezes maior que aqueles detectados nos meninos e suas mães. Além disso, verificaram que crianças negras apresentavam concordância com os genótipos detectados nas suas mães 5 vezes maior do que aqueles detectados em crianças brancas e suas respectivas mães. Outro estudo, realizado com famílias chinesas, também verificou que a transmissão de estreptococos grupo mutans foi gênero específica (REDMO EMANUELSSON & WANG, 1998). Contrário aos estudos de LI & CAUFIELD (1995) e de REDMO EMANUELSSON & WANG (1998), os dados apresentados num estudo com famílias suecas não demonstraram este tipo de aquisição (REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998).

Os dados de transmissão maternal de *S. mutans* (81,25%) e de *S. sobrinus* (31,25%), para crianças que permanecem em torno de 10 horas por dia em creches, contrasta com os achados em populações de crianças que freqüentam creches na China, onde a concordância de genótipos de estreptococos grupo mutans entre mãe-filho é de 45% (LI *et al.*, 2000).

MATTOS-GRANER *et al.* (2001b) relatou que 2 crianças que compartilhavam o mesmo ambiente, de uma creche da cidade de Piracicaba, albergavam 1 genótipo idêntico de *S. mutans*, sugerindo a possibilidade de transmissão horizontal como fonte de infecção da espécie bacteriana *S. mutans*. No presente estudo, não foi verificada transmissão horizontal entre crianças que compartilhavam o mesmo ambiente na creche, uma vez que genótipos idênticos foram encontrados somente em pares mãe-filho. Entretanto, foram detectados alguns genótipos nas crianças diferentes daqueles encontrados em suas mães.

Portanto, não se descartam outras possíveis fontes de transmissão horizontal, como atendentes de creches ou outros indivíduos que mantenham contato com a criança durante as atividades e hábitos diários. O padrão de similaridade entre os diferentes genótipos detectados nas crianças do presente estudo, que compartilhavam o mesmo ambiente na creche, foi muito baixo, sendo menor de 50% na maioria dos casos.

Um estudo realizado em creches, para verificar infecção das crianças por diferentes genótipos de diferentes espécies, demonstrou a ocorrência de genótipos similares entre essas crianças para as espécies colonizadoras do trato nasofaríngeo *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* (YANO *et al.*, 2000). Entretanto, estreptococos grupo mutans não são facilmente transmitidos além de sua estabilidade na cavidade bucal ser modulada por um grupo complexo de fatores, incluindo o número de dentes irrompidos (BERKOWITZ *et al.*, 1975; CATALONATO *et al.*, 1975; CAUFIELD *et al.*, 1993), níveis de estreptococos grupo mutans na saliva das mães (KÖHLER & ANDRÉEN, 1994), estado imunológico da criança (SMITH *et al.*, 1998), presença de hipoplasia de esmalte (LI *et al.*, 1994), consumo de sacarose (van HOUTE *et al.*, 1982). Todos estes fatores podem influenciar o período de tempo e a intensidade da primeira aquisição de estreptococos grupo mutans, explicando variações observadas na colonização por estreptococos grupo mutans entre populações diferentes (FUJIWARA *et al.*, 1991; GRINDEFJORD *et al.*, 1991; CAUFIELD *et al.*, 1993; MATTOS-GRANER *et al.*, 1998).

A diversidade no momento da aquisição variou de 1 a 4 genótipos de *S. mutans* neste estudo, sendo que apenas 1 criança apresentou 4 genótipos. A maioria das crianças (n=9) adquiriu inicialmente apenas 1 genótipo de *S. mutans*, 5 crianças adquiriram 2

genótipos e 1 criança adquiriu 3 genótipos. Este estudo detectou apenas 1 genótipo de *S. sobrinus* no momento da aquisição. Na literatura encontram-se estudos de diversidade genotípica de isolados de estreptococos grupo mutans, que relatam diferentes números de genótipos detectados, variando de 1 a 5 genótipos diferentes por criança (KULKARNI *et al.*, 1989; CAUFIELD & WALKER, 1989; ALALUUSUA *et al.*, 1996; KREULEN *et al.*, 1997; EMANUELSSON *et al.*, 1998; GRONROOS *et al.*, 1998; KOZAI *et al.*, 1999; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b; KLEIN *et al.*, 2002). Em relação a diversidade de *S. sobrinus*, KOZAI *et al.* (1999) encontraram apenas 1 genótipo colonizando a cavidade bucal de crianças. Contudo, não há uma homogeneidade na idade das crianças que são estudadas, e também não existe concordância de que o número de genótipos encontrados esteja relacionado com a idade da criança (KULKARNI *et al.*, 1989), assim como o período de janela de infectividade foi proposto ocorrer num momento anterior na população brasileira (MATTOS-GRANER *et al.*, 1998; FLÓRIO *et al.*, 2002), em relação ao período descrito para a população americana por CAUFIELD *et al.* em 1993.

Pode-se sugerir que a maior diversidade de genótipos detectada nas crianças, em relação àquela detectada na mãe, seja devido ao maior número de isolados estudados nas crianças, além da instabilidade decorrente da fase de desenvolvimento em que a microbiota da criança se encontra. Ressalta-se portanto, que um maior número de isolados possa fornecer dados mais precisos relacionados à presença de diferentes genótipos num mesmo indivíduo (GRONROOS *et al.*, 1998). Embora, não tenha sido encontrada uma correlação positiva entre o número de genótipos e de isolados para *S. mutans*. A diversidade de genótipos de *S. mutans* maternal revela diferentes capacidades de colonização/infectividade na cavidade bucal dos respectivos filhos. Portanto, a existência de grande diversidade

genotípica nas espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* pode resultar na colonização da cavidade bucal por cepas com diferentes características de virulência (KÖHLER *et al.*, 1990; MATTOS-GRANER *et al.*, 2000; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001a), assim como diferentes origens (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b; KLEIN *et al.*, 2002).

A análise da diversidade genotípica de *S. mutans* e de *S. sobrinus* em relação aos sítios de coleta e número de isolados por sítios nas 16 crianças estudadas, revelou que a placa dental mostrou-se um sítio importante, com maior número de genótipos diferentes (35 de 52 para *S. mutans* e 10 de 16 para *S. sobrinus*) e maior número de isolados, embora nem todos os genótipos detectados nas crianças fossem encontrados na mesma. Portanto, a colheita de material de mais sítios da cavidade bucal pode fornecer uma microbiota mais representativa (GRÖNNRÖS *et al.*, 1998; MATOS NASCIMENTO, 2002).

Da mãe foi coletada apenas saliva estimulada, pois a mesma parece ser o principal veículo de transmissão bacteriana. A saliva tem servido de fonte principal para isolamento de microrganismos cariogênicos na grande maioria dos estudos, isto principalmente pela facilidade de coleta, e manipulação das amostras e por se acreditar que ela seja representativa de todos nichos da cavidade oral (GIBBONS & van HOUTE, 1975; RUSSELL & MELVILLE, 1978; DENEPITYA & KLEINBERG, 1982; ASIKAINEN *et al.*, 1991a). Porém, os resultados obtidos no presente trabalho de tese mostram que nem todos os genótipos encontrados na cavidade bucal das crianças estavam presentes na saliva, portanto em estudos mais específicos onde se pretenda estudar com detalhes a colonização da cavidade bucal é fundamental que se realize coletas também de outros nichos da cavidade bucal.

O estudo de GRÖNROOS & ALALUUSUA (2000) demonstra que a distribuição dos genótipos de *S. mutans* esteve na dependência do sítio dentário, sugerindo que estreptococos grupo mutans podem colonizar de maneira seletiva sítios específicos de tecido duro. Também, mostrou que a amostragem de saliva foi eficiente para o isolamento de estreptococos grupo mutans, porém não revelou necessariamente todos os genótipos presentes na cavidade bucal dos voluntários. Portanto, quando se faz amostragem de estreptococos grupo mutans para análise qualitativa é necessário coletar-se amostras de múltiplos sítios da cavidade bucal.

A presença de dentes irrompidos na cavidade bucal de crianças parece ter grande importância para que haja colonização por estreptococos grupo mutans (BERKOWITZ *et al.*, 1975; CATALONATO *et al.*, 1975; CAUFIELD *et al.*, 1993). Neste estudo, em média pelo menos 9 dentes estavam irrompidos no momento da aquisição inicial (mediana=9,5), sendo que o menor número e maior número de dentes irrompidos eram 4 e 16, respectivamente. Dentre as 16 crianças avaliadas, 7 (43,7%) apresentavam apenas os incisivos irrompidos no momento da aquisição inicial, e 9 (52,25%) crianças tinham os primeiros molares irrompidos. CAUFIELD *et al.* (1993), sugeriram que a “janela de infectividade”, período crítico para a colonização da cavidade bucal por estreptococos grupo mutans, entre 19 e 31 meses de idade, está relacionada à erupção dos molares decíduos, cujas superfícies oclusais retentivas favoreceriam a colonização por tais microrganismos.

Julgou-se relevante a realização da análise da diversidade de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus*, detectados na placa dental, em relação ao número de dentes presentes na cavidade bucal das 16 crianças. Tal análise mostrou um padrão variável e não significativo.

Assim como durante a avaliação, a diversidade de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* detectados em relação à idade em meses das 16 crianças, também se mostrou variável e não significativa, ou seja não foi encontrada nenhuma correlação positiva entre número de dentes ou idade das crianças e presença de múltiplos genótipos. O estudo de MATTOS-GRANER *et al.* (2001b) também não observou associação significativa entre diversidade genotípica de estreptococos grupo mutans em relação ao número de dentes erupcionados e idade.

Os resultados encontrados nesta tese permitiram observar que o intervalo de 2 meses entre as colheitas foi fundamental para o discernimento entre colonização efetiva e transitória, pois em alguns casos na colheita subsequente àquela primeira colheita que se mostrou positiva para *S. mutans* e/ou *S. sobrinus* pela primeira vez, tais espécies não foram detectadas, configurando em colonização transitória (FLÓRIO *et al.*, 2002). O fato de que em alguma colheita posterior àquela primeira colheita positiva para as espécies pesquisadas ter sido negativa pode ser porque a microbiota bucal das crianças avaliadas estava em desenvolvimento, desencadeando uma colonização transitória (KÖNÖNEN, 2000) ou porque os níveis de algum genótipo eram baixos. Porém, isto não exclui o fato de que mesmo no presente estudo, o período de 2 meses entre as colheitas, seja insuficiente para variações no padrão de colonização das espécies em análise. Deste modo, para um conhecimento mais específico da dinâmica de colonização por *S. mutans* e *S. sobrinus*, em trabalhos futuros talvez seja necessária a realização um acompanhamento com intervalos de tempo ainda menores.

Ainda, o rastreamento epidemiológico, com colheitas bimestrais, forneceu dados sobre a permanência ou não dos genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* adquiridos

inicialmente. Para *S. mutans* ocorreu estabilidade efetiva para 7 das 16 crianças avaliadas (43,75%). Entretanto, para *S. sobrinus* não ocorreu estabilidade efetiva em nenhuma das 12 crianças em que este microrganismo foi isolado. Observou-se a ocorrência de estabilidade transitória de *S. mutans* e *S. sobrinus* em 3 e 2 crianças, respectivamente. Além disso, 8 e 10 crianças não apresentaram estabilidade transitória ou efetiva de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus*, respectivamente. Ressalta-se que os genótipos classificados com sem estabilidade e com estabilidade transitória podem não ter sido detectados por estarem presentes na cavidade bucal das crianças em níveis abaixo do limite de detecção pelo método de cultura empregado. Na literatura, destacam-se os estudos, nesta linha de pesquisa, realizados por ALALUUSUA *et al.* (1994) e por REDMO EMANUELSON & THORNQVIST (2000).

ALALUUSUA *et al.* (1994) encontrou em 6 de 7 crianças (81,75%), avaliadas aos 5 e aos 10 ou 12 anos, ribotipos de *S. mutans* idênticos em ambas as colheitas. Esses sugeriram que, na idade de 5 anos, a infecção por *S. mutans* já está estabilizada e as cepas colonizadoras mantêm-se permanentes. Enquanto, REDMO EMANUELSON & THORNQVIST (2000) mostrou a estabilidade de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* em 11 famílias, realizando a primeira colheita das amostras aos 3 anos de idade das crianças e a segunda colheita, 2 a 5 anos após a primeira. Nove crianças (81,81%) albergavam 1 ou 2 genótipos similares nas duas ocasiões em que foram realizadas as amostragens. Esses resultados sugerem que genótipos de estreptococos grupo mutans têm um grau de coerência em crianças entre 3 e 8 anos de idade, indicando a persistência (estabilidade) de cepas na cavidade bucal dos mesmos.

Entretanto, o intervalo entre a primeira e a segunda colheita nos estudos realizados por ALALUUSUA *et al.* (1994) e por REDMO EMANUELSON & THORNQVIST (2000) foi relativamente grande, variando de 2 a 7 anos, portanto, pode-se considerar tal intervalo de tempo propício a reinfecção, pelo mesmo genótipo, da cavidade bucal das crianças estudadas, não refletindo a permanência de genótipos adquiridos inicialmente por todo o período do intervalo entre as colheitas.

Em 1989, CAUFIELD & WALKER sugeriram tendência de estabilidade de 1 genótipo de *S. mutans*, transmitido pela mãe, na cavidade bucal de uma criança, pois o mesmo permaneceu por 3 anos na mesma. No presente trabalho de tese, não houve tendência de estabilidade efetiva de todos os genótipos adquiridos da mãe. Embora, aqueles genótipos transmitidos pela mãe e que apresentaram estabilidade efetiva tenham colonizado a cavidade bucal das crianças por um período maior (7,18 meses em média), contrastando com os genótipos não transmitidos pela mãe, que permaneceram por um período menor (2,87 meses em média). Este resultado foi diferente do que se esperava, pelo fato da literatura relatar facilidade de aquisição de genótipos das mães, pois imunoglobulinas adquiridas passivamente da mãe teriam um papel para determinar que cepas de bactérias indígenas colonizariam a criança. LI & CAUFIELD (1995) sugeriram que as mães transferem para seus filhos não somente imunoglobulinas via placenta e colostro, mas também um conjunto de bactérias indígenas capazes de co-existirem com aqueles fatores imunológicos derivados direta ou indiretamente da mãe. De que maneira imunoglobulinas adquiridas da mãe influenciam na seleção pelas crianças de quais bactérias permaneceram e quais delas serão eliminadas ainda precisa ser elucidado, em estudos futuros. Além disso, estudos com crianças americanas revelaram que elas apresentam produção intensa de

anticorpos IgA na saliva contra antígenos de *S. mutans* após a detecção destes microrganismos por volta dos 2 anos de idade, embora o padrão de IgA contra antígenos específicos seja muito variável (SMITH et al., 1998).

O controle de transmissão e infecção por *S. mutans* e *S. sobrinus* é fundamental para o controle da cárie dentária, uma das doenças infecciosas mais comuns em populações brasileiras e internacionais (MATTOS-GRANER et al., 2001c). Dentre as crianças que freqüentam creches da rede pública em Piracicaba – SP, cidade que apresenta água fluoretada desde 1971 e onde o uso do flúor através de dentifrícios é alto, em torno de 3/4 das crianças entre 12 a 18 meses de idade destas instituições apresentam níveis detectáveis de *S. mutans*, sendo que 20% nesta faixa etária apresentam altíssimos níveis bucais desta bactéria (MATTOS-GRANER et al., 1998), caracterizando um grau de infecção muito superior ao observado em crianças da mesma faixa etária em países como E.U.A. Japão e Suécia. Além disso, o estudo prospectivo de crianças com altos níveis bucais deste microrganismo demonstrou uma alta incidência de cárie, de 3 a 10 novas lesões ao ano (MATTOS-GRANER et al., 2001c).

Dentre as 16 crianças avaliadas neste trabalho de tese apenas uma criança apresentou lesão de mancha branca nos incisivos superiores, isto pode ser reflexo do acompanhamento freqüente (bimestral) e das instruções de higiene. E, a não detecção de estreptococos grupo mutans está fortemente relacionada à ausência de manifestações de cárie dentária, e a simples detecção destes microrganismos na cavidade bucal não é suficiente para explicar a atividade de cárie, estando pobremente associada à atividade desta doença (KÖHLER et al., 1990; MATTOS-GRANER et al., 2000; MATTOS-GRANER et al., 2001a).

Portanto, considera-se fundamental o entendimento dos fatores que interferem na capacidade de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* de colonizarem a cavidade bucal e se estabelecerem no biofilme dental. Assim a caracterização da capacidade de aderência dependente de sacarose em cepas transitórias e estáveis e sua correlação com a expressão de genes relevantes a este processo podem fornecer importantes dados para o desenvolvimento de métodos de controle de infecção assim e/ou para identificação de colonizadores mais agressivos da cavidade bucal. Ainda, a análise do papel de genes de competência, do padrão de produção de bacteriocinas e genes de imunidade a bacteriocinas poderá revelar dados mais precisos dos fatores que interferem e/ou colaboram para o sucesso de colonização por determinado genótipo de *S. mutans* e/ou *S. sobrinus*.

7. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos neste estudo, é válido concluir que:

- A principal fonte de infecção de *S. mutans* e *S. sobrinus* é a maternal. E, outras rotas de transmissão podem estar presentes;
- No momento da aquisição as crianças albergam de 1 a 4 genótipos distintos de *S. mutans* e, 1 único genótipo de *S. sobrinus*. Durante o rastreamento epidemiológico longitudinal a diversidade genotípica varia em algumas crianças, demonstrando a instabilidade da microbiota bucal em desenvolvimento;
- Os genótipos adquiridos pelas crianças possuem estabilidade efetiva e/ou transitória, refletindo o desenvolvimento da microbiota bucal nas crianças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS^γ

1. AALTONEN, A.S.; TENOVUO, J. Association between mother-infant salivary contacts and caries resistance in children: a cohort study. **Pediatr Dent**, Chicago, v.16, n.2, p.110-116, Mar-Apr. 1994.
2. AJDIC, D. *et al.* Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc Natl Acad Sci**, Washington, v.99, n.22, p.14434-14439, Oct. 2002.
3. ALALUUSUA, S. *et al.* Caries-related microbiological findings in a group of teenagers and their parents. **Caries Res**, Basel, v.23, n.1, p.49-54, Jan.-Feb. 1989b.
4. ALALUUSUA, S. *et al.* Oral colonization by more than one clonal type of *Streptococcus mutans* in children with nursing-bottle dental caries. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.41, n.2, p.167-173, Feb. 1996.
5. ALALUUSUA, S. *et al.* Ribotyping shows intrafamilial similarity in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.8, n.4, p.225-229, Aug. 1993.
6. ALALUUSUA, S. *et al.* The demonstration by ribotyping of the stability of oral *Streptococcus mutans* infection over 5 to 7 years in children. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.39, n.6, p.467-471, June 1994.
7. ALALUUSUA, S. Transmission of *Streptococcus mutans*. **Proc Finn Dent Soc**, Helsinki, v., 87, n.4, p.443-447, 1991.

^γ De acordo com a NBR-6023, de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos Periódicos de conformidade com o Medline.

8. ALALUUSUA, S.; MALMIVIRTA, R. Early plaque accumulation - a sign for caries risk in young children. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.22, n.5, p.273-276, Oct. 1994.
9. ALALUUSUA, S.; MYLLARNIEMI, S.; KALLIO, M. *Streptococcus mutans* infection level and caries in a group of 5-year-old children. **Caries Res**, Basel, v.23, n.3, p.190-194, May-June 1989a.
10. ANTHONY, U.; MUNSHI, A.K. Sibling versus maternal *S. mutans* levels as related to dental caries. **J Clin Pediatr Dent**, Birmingham, v.21, n.2, p.145-150, Winter 1997.
11. ASIKAINEN, S.; ALALUUSUA, S.; SÁXEN, L. Recovery of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. **J Periodontol**, Chicago, v.62, n.3, p.203-206, Mar. 1991.
12. BECKER, M.R. *et al.* Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. **J Clin Microbiol**, Washington, v.40, n.3, p.1001-1009, Mar 2002.
13. BERKOWITZ, R. Etiology of nursing caries: a microbiologic perspective. **J Public Health Dent**, Albany, v.56, n.1, p.51-54, Winter 1996.
14. BERKOWITZ, R.J.; JONES, P. Mouth-to-mouth transmission of the bacterium *Streptococcus mutans* between mother and child. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.30, n.4, p.377-379, 1985.
15. BERKOWITZ, R.J.; JORDAN, H.V. Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.20, n.11, p.725-730, Nov. 1975.

16. BERKOWITZ, R.J.; JORDAN, H.V.; WHITE, G. The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.20, n.3, p.171-174, Mar. 1975.

17. BERKOWITZ, R.J.; TUNER, J.; GREEN, P. Maternal salivary levels of *Streptococcus mutans* and Primary Oral Infection of infants. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.26, n.2, p.147-149, 1981.

18. BOWDEN, G.; EDWARDSSON, S. Ecologia oral e a cárie dentária. In: **Cariologia Clínica** Ed Santos p.45-62, 1995.

19. BOWDEN, G.H.W.; HAMILTON, I.R. Survival of oral bacteria. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.9, p.54-85, 1998.

20. BROWN, J.P.; JUNNER, C.; LIEW, V. A study of *Streptococcus mutans* levels in both infants with bottle caries and their mothers. **Aust Dent J**, Saint Leonards, v.30, n.2, p.96-98, Apr. 1985.

21. BUISCHI, Y.P.; AXELSSON, P. Controle mecânico da placa dental realizado pelo paciente. In: *ABOPREV - Promoção de Saúde Bucal*. São Paulo: Artes Médicas, 1^a Edição, p.113-29, 1997.

22. CARLSSON, J. *et al.* Early establishment of *Streptococcus salivarius* in the mouth of infants. **J Dent Res, Chicago**, v.49, n.2, p.415-418, Mar. 1970b.

23. CARLSSON, J. *et al.* Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouth of infants. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.15, n.12, p.1143-1148, Dec. 1970a.

24. CARLSSON, P.; OLSSON, B.; BRATTHALL, D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.30, n.3, p.265-268, 1985.

25. CATALONATO, F.A.; SHKLAIR, I.L.; KEENE, H.J. Prevalence and localization of *Streptococcus mutans* in infants and children. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.91, n.3, p.606-609, Sep. 1975.
26. CAUFIELD, P.W. Dental caries – a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. **Pediatric Dentistry**, Chicago, v.19, n.8, p.491-97, Nov-Dec. 1997.
27. CAUFIELD, P.W.; CHILDERS, N.K.; ALLEN, D.N.; HANSEN, J.B. Distinct bacteriocins correlate with different groups of *Streptococcus mutans* plasmids. **Infect Immun**, Washington, v.48, n.1, p.51-56, Apr. 1985.
28. CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J Dent Res**, Chicago, v.72, n.1, p.37-45, Jan. 1993.
29. CAUFIELD, P.W. *et al.* Plasmid-containing strains of *Streptococcus mutans* cluster within family and racial cohorts: Implications in natural transmission. **Infect Immun**, Washington, v.56, n.12, p.3216-20, Dec. 1988.
30. CAUFIELD, P.W.; WALKER, T.M. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. **J Clin Microbiol**, Washington, v.27, n.2, p.274-278, Feb. 1989.
31. CAUFIELD, P.W.; WANNEMUEHLER, Y.M.; HANSEN, J.B. Familial clustering of the *Streptococcus mutans* cryptic plasmid strain in a dental clinic population. **Infect Immun**, Washington, v.38, n.2, p.785-787, Nov. 1982.
32. DASANAYAKE, A.P. *et al.* Distribution and determinants of mutans streptococci among African-American children and association with selected variables. **Pediatr Dent**, Chicago, v.17, p.192-198, 1995.

33. DASANAYAKE, A.P. *et al.* Transmission of mutans streptococci to infants following short term application of an iodine-NaF solution to mothers' dentition. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.21, n.3, p.136-142, June 1993.

34. DAVEY, A.L.; ROGERS, A.H. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.29, n.6, p.453-460, 1984.

35. DEMUTH, D.R. *et al.* Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinin. **Microb Pathog**, v.9, n.3, p.199-211, Sep. 1990.

36. DENEPITYA, L.; KLEINBERG, I. A comparison of the microbial compositions of pooled human dental plaque and salivary sediment. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.27, n.9, p.739-745, 1982.

37. EDWARDSSON, S.; MEJARE, B. *Streptococcus milleri* (Guthof) and *Streptococcus mutans* in the mouths of infants before and after tooth eruption. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.23, n.9, p.811-4, 1978.

38. FITZSIMMONS, S. *et al.* Clonal diversity of *Streptococcus mitis* biovar 1 isolates from the oral cavity of human neonates. **Clin Diagn Lab Immunol**, Washington, v.3, n.5, p.517-522, Sep. 1996.

39. FLÓRIO F.M. *et al.* Precocidade da aquisição de estreptococos grupo mutans. **Rev Pesq Odontol Bras**, São Paulo, v.16, p.24, Set. 2002 (Abstract).

40. FUJIWARA, T. *et al.* Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.19, n.3, p.151-154, June 1991.

41. GIBBONS, R.J. Microbial ecology. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. **J Dent Res, Chicago**, v.63, n.3, p.378-385, Mar. 1984.
42. GIBBONS, R.J.; KAPSIMALIS, B.; SOCRANSKY, S.S The source of salivary bacteria. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.9, n.1, p.101-103, Jan.-Feb. 1964.
43. GIBBONS, R.J.; VAN HOUTE, J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Ann Rev Microbiol**, Palo Alto, v.29, p.19-44, 1975.
44. GIBBONS, R.J.; VAN HOUTE, J. Selective bacterial adherence to oral ephitelial surfaces and its role as an ecological determinant. **Infect Immun**, Washington, v.3, p.567-573, 1971.
45. GOLD, O.C.; JORDAN, H.V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *S. mutans*. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.18, p.1356-1364, 1973.
46. GONÇALVES, R.B. *et al.* Genetic diversity and cariogenic potential of *Streptococcus mutans*. **J Dent Res, Chicago**, v.81 (special issue A), p.286, Mar. 2002 (Abstract).
47. GREENE, J.C.; VERMILLION, J.R. The simplified oral hygiene index. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.68, p.7-13, 1964.
48. GRENIER, D.; MAYRAND, D. Nutritional relationship between oral bacteria. **Infect Immun**, Washington, v.53, n.3, p.616-620, Sep. 1986.
49. GRINDEFJORD, M. *et al.* Stepwise prediction of dental caries in children up to 3.5 years of age. **Caries Res**, Basel, v.30, n.4, p.256-266, July-Aug. 1996.
50. GRÖNROOS, L. *et al.* Mutacin production by *Streptococcus mutans* may be promote transmission of bacteria mother to child. **Infect. Immun.** Washington, v.66, n.6, p.2595-2600, June 1998.

51. GRÖNROOS, L.; ALALUUSUA, S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. **Caries Res**, Basel, v.34, n.6, p.474-480, Nov-Dec. 2000.

52. HAMADA, S.; SLADE, H.D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, Washington, v.44, n.2, p.331-384, June 1980.

53. HILLMAN, J.D.; SOCRANSKY, S.S.; SHIVES, M. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.30, n.11-12, p.791-795, 1985.

54. HIROSE, H. *et al.* Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. **Caries Res**, Basel, v.27, n.4, p.292-297, July-Aug. 1993.

55. HOHWY, J. *Streptococcus mitis* biovar 1 in the human oral cavity and pharynx. Studies on serology, population dynamics, and antigenicity in relation to salivary antibodies (dissertation). Aarhus, Denmark. University of Aarhus; 1997.

56. HOROWITZ, S.H. Research issues in early childhood caries. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.26 (suppl. 1), p.67-81, 1998.

57. JACOB, F. *et al.* Definition de quelques termes relatifs a la lysogénie. **Ann Inst Pasteur**, v.84, p.222-224, 1953.

58. JORDAN, C.; LEBLANC, D.J. Influences of orthodontic appliances on oral population of mutans streptococci. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.17, n.2, p.65-71, Apr. 2002

59. KEYES, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.1, p.304-20, 1960.
60. KLEIN M.I. *et al.* Transmissão, diversidade e estabilidade clonal de *S. mutans*: estudo longitudinal em crianças. **Rev Pesq Odontol Bras**, São Paulo, v.16, p.187, Set. 2002 (Abstract).
61. KLEIN, H.; PALMER, C.E.; KNUTSON, J.W. Studies on dental caries. I. Dental status and dental needs of elementary school children. **Pub Health Rep**, v.53, p.751-65, 1938.
62. KÖHLER, B.; ANDRÉEN, I. Influence of caries-preventive measures in mothers on cariogenic bacteria and caries experience in their children. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.39, n.10, p.907-11, Oct. 1984.
63. KÖHLER, B.; ANDRÉEN, I.; JONSSON, B. The earlier the colonization by *mutans streptococci*, the higher the caries prevalence at 4 years of age. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.3, n.1, p.14-17, Mar. 1988.
64. KÖHLER, B.; ANDRÉEN, I.; JONSSON, B. The effect of caries-preventive measures in mothers on dental caries and the oral presence of the bacteria *Streptococcus mutans* and lactobacilli in their children. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.29, n.11, p.879-883, 1984.
65. KÖHLER, B.; BRATTHAL, D. Intrafamilial levels of *Streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.86, n.1, p.35-42, Jan. 1978.
66. KÖHLER, B.; BRATTHAL, D.; KRASSE, B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.28 n.3, p.225-231, 1983.

67. KÖHLER, B.; KRASSE, B. Human strains of mutans streptococci show different cariogenic potential in the hamster model. **Oral Microbiol Immunol**, v.5, n.4, p.177-80, Aug. 1990.
68. KOLENBRANDER, P.E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, v.54, p.413-37, 2000.
69. KOLENBRANDER, P.E.; ANDERSEN, I. Multigeneric aggregations among oral bacteria: a network of independent cell-to-cell interactions. **J Bacteriol**, Washington, v.168, n.2, p.851-859, Nov. 1986.
70. KÖNÖNEN E. *et al.* Establishment of oral anaerobes during the first year of life. **J Dent Res, Chicago**, v.78, n.10, p.1634-1639, Oct. 1999.
71. KÖNÖNEN E. *et al.* The oral Gram-negative anaerobic microflora in young children: longitudinal changes from edentulous to dentate mouth. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.9, n.3, p.136-141, June 1994.
72. KÖNÖNEN, E. Development of oral bacterial flora in young children. **Ann Med**, Helsinki, v.32, n.2, p.107-112, Mar. 2000.
73. KORESTEIN, K.; ECHEVERRI, E.A.; KEENE, H.J. Preliminary observations on the relationship between mutans streptococci and dental caries experience within black, white, and Hispanic families living in Houston, Texas. **Pediatr Dent**, Chicago, v.17, n.7, p.445-450, Nov-Dec. 1995.
74. KOZAI, K. *et al.* Intrafamilial distribution of mutans streptococci in Japanese families and possibility of father-to-child transmission. **Microbiol Immunol**, Tokyo, v.43, n.2, p.99-106, 1999.

75. KOZLOWSKI, F.C. Relação entre o fator socioeconômico e a prevalência e severidade de fluorose e cárie dentária. Piracicaba, SP. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba., 2001.
76. KRASSE, B. *et al.* Implantation of caries-inducing streptococci in the human oral cavity. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.12, n.2, p.231-36, Feb. 1967.
77. KREULEN, C.M.; *et al.* *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. **ASDC J Dent Child**, Fulton, v.64, n.2, p.107-111, Mar-Apr. 1997.
78. KULKARNI, G.V.; CHAN, K.H.; SANDHAM, .J. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. **J Dent Res, Chicago**, v.68, n.7, p.1155-1161, July 1989.
79. LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v.33, p.159-174, 1977.
80. LI Y, CAUFIELD PW. Arbitrarily primed chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.13, n.1, p.17-22, Feb. 1998.
81. LI Y, WANG W, CAUFIELD PW. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlates with breast-feeding experience among Chinese families. **Caries Res**, Basel, v.34, n.2, p.123-132, Mar-Apr. 2000.
82. LI, Y.; CAUFIELD, P.W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **J Dent Res, Chicago**, v.74, n.2, p.681-685, Feb. 1995.
83. LI, Y.; NAVIA J.M.; CAUFIELD, P.W. Colonization by mutans streptococci in the mouth of 3- and 4-year-old Chinese children with or without enamel hiplopasia. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.39, n.12, p.1057-1062, Dec. 1994.

84. LINDQUIST, B. Mutans streptococci in human dentition. Thesis, Göteborg, University of Göteborg, 1991.
85. LINDQUIST, B.; EMILSON, C.G. Dental location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human harboring both species. **Caries Res**, Basel, v.25, n.2, p.146-152, Mar-Apr. 1991.
86. LOESCHE WL. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev**, Washington, v.50, n.4, p.353-380, Dec. 1986.
87. LOESCHE, W.J. Importance of nutrition in gingival crevice microbial ecology. **Periodontics**, Brookline, v.6, n.6, p.245-249, Dec. 1968.
88. LUCAS, V.S.; BEIGHTON, D.; ROBERTS, G.J. Composition of the oral streptococcal flora in healthy children. **J Dent**, Oxford, v.28, n.1, p.45-50, Jan. 2000.
89. MACRINA, F.L. *et al.* Survey of the extrachromosomal gene pool of *Streptococcus mutans*. **Infect Immun** Washington, v.17, n.1, p.215-226, July 1977.
90. MARSH, P.D. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. **Proc Finn Dent Soc**, Helsinki, v.87, n.4, p.515-525, 1991.
91. MASUDA, N. *et al.* Transmission of *Streptococcus mutans* in some selected families. **Microbios**, Cambridge, v.44, n.181S, p.223-232, 1985.
92. MATEE, M.I.N. *et al.* Mutans streptococci and lactobacilli in breast-fed children with rampant caries. **Caries Res**, Basel, v.26, n.3, p.183-87, May-June 1992.
93. MATEE, M.I.N. *et al.* Mutans streptococci in caries-active and caris-free infants in Tanzania. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.8, n.5, p.322-324, Oct. 1993.

94. MATOS NASCIMENTO, M. Polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados da cavidade oral de indivíduos com lesões de cáries coronária e radicular. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2002.
95. MATOS NASCIMENTO, M.; HÖFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. Clonal diversity of *Streptococcus mutans* in individuals with coronal and root caries. **J Dent Res**, Chicago, v.81 (Spec Iss A), p.351, Mar. 2002 (Abstract).
96. MATOS NASCIMENTO, M.; HÖFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. Polimorfismo genético de *S. mutans* isolados de cárie dental. **Rev Pesq Odontol Bras**, São Paulo, v.15, p.81, Set. 2001 (Abstract).
97. MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. **Caries Res**, Basel, v.32, n.5, p.319-323, Sep-Oct. 1998.
98. MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Caries prevalence in 6-36-month-old Brazilian children. **Community Dental Health**, London, v.13, n.2, p.96-98, June 1996.
99. MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. **Infect Immun**, Washington, v.69, n.11, p.6931-6941, Nov. 2001a.
100. MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. **J Clin Microbiol**, Washington, v.39, n.6, p.2313-2316, June 2001b.
101. MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Mutans streptococci oral colonization in 12-30-month-old Brazilian children over a one-year follow-up period. **J Public Health Dent**, Richmond, v.61, n.3, p.161-167, Summer 2001c.

102. MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. **J Dent Res**, Chicago, v.79, p.1371-1377, 2000.

103. MUNRO, C. *et al.* Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferases and fructosyltransferases mutants constructed by allelic exchange. **Infect Immun**, Washington, v.59, n.7, p.2316-2323, July 1991.

104. NAPIMOGA, M.H. *et al.* Potencial cariogênico de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* isolados de voluntários livres de cárie e cárie ativos. **Rev Pesq Odontol Bras**, São Paulo, v.15, p.47, Set. 2001 (Abstract).

105. NYVAD, B. Microbial colonization of human tooth surfaces. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand**, Copenhagen, v.101, p.7-45, 1993.

106. OHO, T. *et al.* Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by Polimerase chain reaction. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.15, n.4, p.258-262, Aug. 2000.

107. OOSHIMA, T. *et al.* Maternal transmission and dental caries induction in Sprague-Dawley rats infected with *Streptococcus mutans*. **Microbiol Immunol**, Tokyo, v.32, n.8, p.785-94, 1988.

108. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – World Health Organization – Oral Health Surveys: Basic methods, 4th ed, p.66, 1997.

109. REDMO EMANUELSSON, I.; LI, Y.; BRATTHALL, D. Genotyping shows different strains of mutans streptococci between father and child and within parental pairs in Swedish families. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.13, n.5, p.271-277, Oct. 1998.

110. REDMO EMANUELSSON, I.; THORQVIST, E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. **Caries Res**, Basel, v.34, n.2, p.133-139, Mar-Apr. 2000.
111. REDMO EMAUELSSON, I.; WANG, X. Demonstration of identical strains of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v.106, n.3, p.788-794, June 1998.
112. ROGERS, A.H. Bacteriocin typing of *Streptococcus mutans* strains isolated from family groups. **Aust Dent J**, Saint Leonards, v.25, n.5, p.279-283, Oct. 1980.
113. ROGERS, A.H. Bacteriocin types of *Streptococcus mutans* in human mouth. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.20, p.853-858, 1975.
114. ROSA, E.A.R. Uso da eletroforese de enzimas constitutivas na caracterização interespecífica de leveduras orais. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2000.
115. ROSA, R.T. Detecção de polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados de indivíduos livres de cárie (CPOD=0). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2001.
116. ROSA, R.T. *et al.*. Polimorfismo genético de cepas de *Streptococcus mutans* isoladas de indivíduos livres de cárie. **Rev Pesq Odontol Bras**, São Paulo, v.15, p.140, Set. 2001 (Abstract).
117. RUSSELL, C.; MELVILLE, T.H. A review. Bacteria in the human mouth. **J Appl Bacteriol**, Oxford / New York, v.44, n.2, p.163-181, Apr. 1978.
118. SAARELA, M. *et al.* Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.41, n.8/9, p.821-826, Aug-Sep. 1996.

119. SAARELA, M. *et al.*. Persistence of oral colonization by the same *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain(s). **J Periodontol**, Chicago, v.70, n.5, p.504-509, May 1999.
120. SCHROEDER VA, MICHALEK SM, MACRINA FL. Biochemical characterization and evaluation of virulence of a fructosyltransferase-deficient mutant of *Streptococcus mutans* V403. **Infect Immun**, Washington, v.57, n.11, p.3560-3569, Nov. 1989.
121. SCHUSTER, G.S.; MORSE, P.K.; DIRKSEN, T.R. Interaction of microbial challenge and age inoculation in the production of dental caries in rats. **Caries Res**, Basel, v.12, n.1, p.28-34, 1978.
122. SEOW, WK. Biological mechanisms of early childhood caries. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.26 (suppl 1), p.8-27, 1998.
123. SMITH, D. J. *et al.* Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial *mutans streptococcal* infection. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.13, n.5, p.278-285, Oct. 1998.
124. SNEATH, P. H.A.; SOKAL, R. R. Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco, p.230-234, 1973.
125. SOCRANSKY, S.S. *et al.* Association between microbial species in subgingival plaque samples. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.3, n.1, p.1-7, Mar. 1988.
126. SOCRANSKY, S.S.; MANGANIELLO, S.D. The oral microbiota of man from birth to senility. **J Periodontol**, Chicago, v.42, n.8, p.485-496, Aug. 1971.
127. SOLOMON, J.M.; GROSSMAN, A.D. Who's competent and when: Regulation of natural genetic competence in bacteria. **Trends Genet**, v.12, p.150-154, 1996.

128. SPOLIDÓRIO, D.M. *et al.* Identificação genética intrafamiliar de *Streptococcus mutans* por AP-PCR. **Rev Pesq Odontol Bras**, São Paulo, v.15, p.144, Set. 2001.
129. SPOLIDORIO, D.M.P. Biotipos de *Streptococcus* grupo mutans e avaliação de parâmetros clínicos e microbiológicos entre escolares de diferentes classes sócio-econômicas. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba., 1997.
130. STIPP, R.N. *et al.* Estreptococos do grupo mutans em crianças com cárie ativa ou paralisada. **Rev Pesq Odontol Bras**, São Paulo, v.15, p.25, Set. 2001 (Abstract).
131. STIPP, R.N. *et al.*. Frequência de isolamento e análise *in vitro* do potencial cariogênico de estreptococos grupo *mutans*. **Rev Pesq Odontol Bras**, São Paulo, v.16, p.96, Set. 2002 (Abstract).
132. TANNER, A.C.R. *et al.* The microbiota of young children from tooth and tongue samples. **J Dent Res**, Chicago, v.80, n.12, p.2060-2065, 2002.
133. TANZER, J.M. Dental caries is a transmissible infectious disease: The Keyes and Fitzgerald revolution. **J Dent Res**, Chicago, v.74, n.9, p.1536-1542, Sep. 1995.
134. TENOVUO, J.; LAGERLÖF, F. Saliva, in Thylstrup A., Fejerskov O: Cariologia clínica. São Paulo: Santos, p. 17-43, 1995.
135. THORILD, I.; LINDAU-JONSON, B.; TWETMAN, S. Prevalence of salivary *Streptococcus mutans* in mothers and their preschool children. **Int J Paediatr Dent**, Oxford, v.12, n.1, p.2-7, Jan. 2002.
136. van HOUTE, J.; GIBBS, G.; BUTERA, C. Oral flora of children with “nursing bottle caries”. **J Dent Res**, Chicago, v.61, n.2, p.382-385, Feb. 1982.


137. van HOUTE, J.; YANOVER, L.; BRECHER, S. Relationship of level of the bacterium *Streptococcus mutans* in saliva of children and their parents. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.26, p.381-386, 1981.
138. van LOVEREN, C.; BUIJS, J.F.; ten CATE, J.M. Similarity of bacteriocin activity profiles of mutans streptococci within the family when the children acquire the strains after the age of 5. **Caries Res**, Basel, v.34, n.6, p.481-485, Nov-Dec. 2000.
139. van PALENSTEIN HELDERMAN, W.H.; LJSSELDIJK, M.; HUIS in't VELD, J.H.J. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.28, n.7, p.599-603, 1983.
140. WALTER, L.R.F.; FERELLE, A.; ISSAO, M. Odontologia para o bebê: odontopediatria do nascimento aos 3 anos. Artes Médicas, São Paulo, capítulo 5 Educação Odontológica: Necessidade Educativas, p. 73-92, 1ª edição, 1997.
141. WAN, A.K.L. *et al.* Oral colonization of *Streptococcus mutans* in six-month-old predentate infants. **J Dent Res**, Chicago, v.80, n.12, p.2060-2065, 2001.
142. WELSH, J.; McCLELLAND, D.L. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v.18, n.24, p.7213-7218, Dec. 1990.
143. WHILEY, R.A.; BEIGHTON, D. Current classification of the oral streptococci, **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.13, n.4, p.195-216, Aug. 1998.
144. WHITTENBURY, R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. **J Gen Microbiol**, Cambridge, v.35, n.1, p.13-26, 1964.

145. WILLIAMS, J.G.K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, Nov. 1990.
146. YAMASHITA, Y. *et al.* Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction on the specific-pathogen-free rat model. **Infect Immun**, Washington, v.61, n.9, p.3811-3817, Sep. 1993.
147. YANO, H. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. **J Clin Microbiol**, Washington, v.38, n.2, p.625-629, Feb. 2000.
148. ZICKERT, I.; EMILSON, C.G.; KRASSE, B. Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries. **Infect Immun** Washington, v.39, n.2, p.982-985, Feb. 1983.

ANEXO 1:

| | |
|---|---|
| <p align="center">COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Odontologia de Piracicaba CERTIFICADO</p> | |
| | <p>Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Detecção e isolamento dos estreptococos do grupo <i>mutans</i> de crianças brasileiras de 4 a 28 meses de idade, submetidas ou não a programa em promoção de saúde bucal", sob o protocolo nº 57/2000, da Pesquisador Flávia Martão Flório, sob a responsabilidade dos Profs. Drs. Antonio Carlos Pereira e Reginaldo Bruno Gonçalves, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - FOP.</p> |
| <p>Piracicaba, 04 de agosto de 2000</p> | <p>We certify that the research project with title "Detection and isolation of the <i>Streptococcus mutans</i> from Brazilian's children, aging from 4 to 28 months, submitted (or not) to dental health promotion program", protocol nº 57/2000, by Researcher Flávia Martão Flório, responsibility by Prof. Dr. Antonio Carlos Pereira and Reginaldo Bruno Gonçalves, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).</p> |
| <p> Prof. Dr. Pedro-Lúiz Rosalen Secretário - CEP/FOP/UNICAMP</p> | <p> Piracicaba, SP, Brazil, August 04 2000 Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes Coordenador - CEP/FOP/UNICAMP</p> |


ANEXO 2:



UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CERTIFICADO




Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Transmissão, diversidade e estabilidade clonal de *S. mutans* e *S. sobrinus*: estudo longitudinal em crianças", sob o protocolo nº **099/20020**, da Pesquisadora **Marlise Inêz Klein**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.


Piracicaba, 07 de agosto de 2002

We certify that the research project with title "Transmission, diversity and stability of *S. mutans* and *S. sobrinus* genotypes: longitudinal study in children", protocol nº **099/2002**, by Researcher **Marlise Inêz Klein**, responsibility by Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, August 07 2002



Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**
 Secretário
 CEP/FOP/UNICAMP



Prof. Dr. **Antonio Bento Alves de Moraes**
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

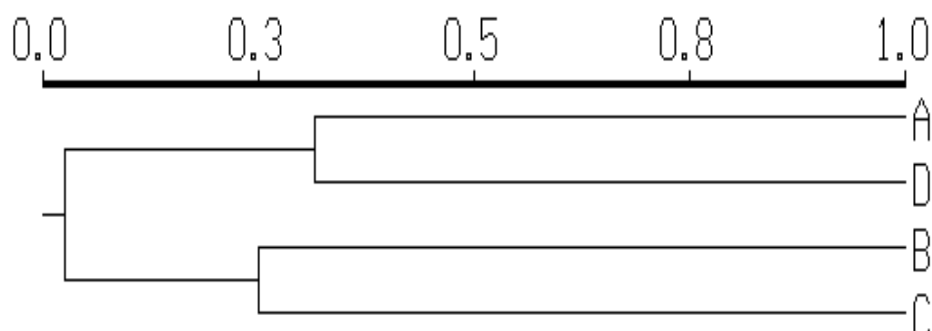
ANEXO 3: Isolamento e identificação dos isolados bacterianos.

Total de isolados provenientes de 16 pares mãe-filho e submetidos à identificação por PCR:

| 16 pares | Todos os isolados | | Isolados identificados como <i>S. mutans</i> | | Isolados identificados como <i>S. sobrinus</i> | |
|---------------|-------------------|-----------------|---|-----------------|---|----------------|
| | criança | mãe | criança | mãe | criança | mãe |
| 2 | 96 | 14 | 75 | 8 | 20 | 4 |
| 3 | 145 | 15 | 105 | 15 | 11 | - |
| 4 | 65 | 13 | 55 | 9 | 8 | 1 |
| 5 | 27 | 16 | 27 | 15 | - | - |
| 7 | 69 | 15 | 50 | 14 | 11 | 1 |
| 8 | 139 | 16 | 118 | 16 | 5 | - |
| 10 | 24 | 15 | 9 | 15 | 3 | - |
| 12 | 37 | 14 | 34 | 14 | 2 | - |
| 13 | 122 | 6 | 111 | 6 | - | - |
| 17 | 8 | 20 | 2 | 2 | 1 | 17 |
| 18 | 17 | 14 | 13 | 13 | 1 | - |
| 20 | 19 | 11 | 13 | 9 | 6 | 2 |
| 23 | 60 | 18 | 58 | 18 | 2 | - |
| 24 | 3 | 13 | 3 | 13 | - | - |
| 28 | 55 | 16 | 35 | 14 | 14 | 2 |
| 32 | 65 | 14 | 65 | 14 | - | - |
| Total parcial | 951 (80,53%) | 230 (19,47%) | 773 (79,85%) | 195 (20,15%) | 84 (75,68%) | 27 (24,32%) |
| Total geral | 1181 (100%) | | 968 (81,96%) | | 111 (9,39%) | |

ANEXO 4: DENDOGRAMAS

A Análise dos perfis eletroforéticos obtidos pela técnica de AP-PCR, com os *primers* OPA-02 e OPA-13, propiciou a construção de dendogramas representativos dos diferentes genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* detectados para cada par mãe-filho estudados. Os diferentes genótipos foram codificados por letras maiúsculas para facilitar a leitura dos resultados em cada par mãe-filho. Iniciou-se a codificação pelos genótipos detectados nas mães com a letra A para ambos *S. mutans* e *S. sobrinus*. A partir do dendograma obtido para cada par, construiu-se uma tabela explicativa correspondente.



Dendograma 1: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 2.

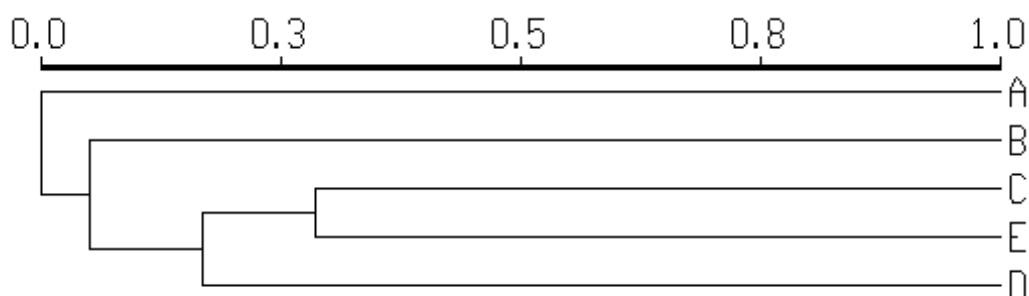
Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrados no par 2:

| | | | | Genótipos encontrados no par 2 (clone /sítio*) | | | |
|-----------|----------|-------------|---------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) | Clone D (sítio) |
| | 4 | 5 | 15,4 | - | 4 isolados (4D) | 1 isolado (D) | - |
| | 5 | 5 | 17,7 | 5 isolados (5D) | - | - | - |
| | 6# | 1 | 21,5 | - | - | 1 isolado (D) | - |
| | 7 | 4 | 24,9 | 4 isolados (4D) | - | - | - |
| | 8 | 27 | 27,0 | 27 isolados (8S, 7L, 6G, 6D) | - | - | - |
| | 9 | 6 | 29,1 | 6 isolados (1S, 4G, 1D) | - | - | - |
| | 10 | 27 | 31,7 | 26 isolados (6S, 7L, 8G, 5D) | - | - | 1 isolado (S) |
| Mãe | | | | 8 isolados (S) | - | - | - |
| Conclusão | | | | Houve transmissão vertical e estabilidade do clone A (6,8 meses consecutivos) | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D)

Na colheita 6 foram isoladas 19 cepas de *S. sobrinus*.

Total de isolados: 75 da criança e 8 da mãe.



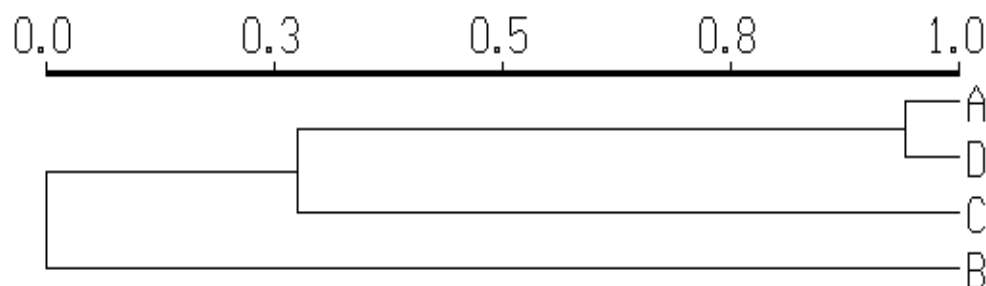
Dendrograma 2: representativo dos diferentes genótipos de *S. sobrinus* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 2.

Tabela explicativa para genótipos de *S. sobrinus* encontrados no par 2:

| | | | | Genótipos encontrados no par 2 (clone /sítio*) | | | | |
|-----------|----------|--|---------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) | Clone D (sítio) | Clone E (sítio) |
| | 4 | - | 15,4 | - | - | - | - | - |
| | 5 | - | 17,7 | - | - | - | - | - |
| | 6 | 19 | 21,5 | - | - | - | 19 isolados (D) | - |
| | 7 | 1 | 24,9 | - | - | - | - | 1 isolado (L) |
| | 8 | - | 27,0 | - | - | - | - | - |
| | 9 | - | 29,1 | - | - | - | - | - |
| | 10 | - | 31,7 | - | - | - | - | - |
| Mãe | | | | 2 isolados (S) | 1 isolado (S) | 1 isolado (S) | - | - |
| Conclusão | | Não houve transmissão vertical e nem estabilidade. | | | | | | |

* Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D)

Total de isolados: 20 da criança e 4 da mãe.



Dendrograma 3: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 3.

Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrados no par 3:

| | | | | Genótipos encontrados no par 3 (clone /sítio*) | | | |
|-----------|----------|--|---------------|--|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) | Clone D (sítio) |
| | 4 | 17 | 16,8 | 15 isolados (6S, 5G, 3L, 1D) | 1 isolado (S) | 1 isolado (S) | - |
| | 5 | 22 | 20,3 | 15 isolados (3S, 5G, 5L, 2D) | - | - | 7 isolados (7D) |
| | 6# | - | 22,2 | - | - | - | - |
| | 7 | 18 | 24,8 | 18 isolados (18D) | - | - | - |
| | 8 | 18 | 26,9 | - | 18 isolados (3S, 1G, 2L, 12D) | - | - |
| | 9 | 10 | 29,2 | - | 10 isolados (4S, 3G, 4L) | - | - |
| | 10 | 20 | 31,1 | - | 20 isolados (7S, 6G, 6L) | - | - |
| Mãe | | | | 15 isolados (S) | - | - | - |
| Conclusão | | Houve transmissão vertical (genótipo A) e, estabilidade do clone A (inicialmente, por 3,5 meses consecutivos) e do clone B (posteriormente, por 4,8 meses) | | | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

Na colheita 6 não foi isolados nenhuma cepa de *S. mutans* nem de *S. sobrinus*.

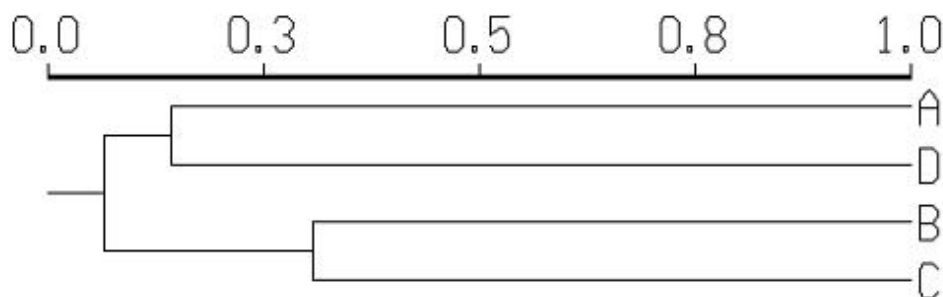
Total de isolados: 105 da criança e 15 da mãe.

Tabela explicativa para genótipos de *S. sobrinus* encontrados na criança 3 (*S. sobrinus* não foi isolado da mãe):

| Criança | | | Genótipos encontrados na criança |
|-----------|-------------|---------------|---|
| Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio)* |
| 4 | 2 | 16,8 | 2 isolados (1S, 1L) |
| 5 | - | 20,3 | - |
| 6# | - | 22,2 | - |
| 7 | 9 | 24,8 | 9 isolados (9D) |
| 8 | - | 26,9 | - |
| 9 | - | 29,2 | - |
| 10 | - | 31,1 | - |
| Conclusão | | | Não houve transmissão nem estabilidade. |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

Total de isolados: 11 da criança.



Dendrograma 4: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 4.

Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans*:

| | | | | Genótipos encontrados no par 4 (clone /sítio*) | | | |
|-----------|----------|--|---------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) | Clone D (sítio) |
| | 7 | 9 | 20,2 | 9 isolados (D) | - | - | - |
| | 8# | - | 23,5 | - | - | - | - |
| | 9 | 25 | 25,9 | 25 isolados (2S, 1L, 1G, 21D) | - | - | - |
| | 10 | 21 | 27,6 | 21 isolados (7S, 4L, 1G, 9D) | - | - | - |
| Mãe | | | | 2 isolados (S) | 5 isolados (S) | 1 isolado (S) | 1 isolado (S) |
| Conclusão | | Houve transmissão vertical e estabilidade do clone A (1,7 meses consecutivos) | | | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

Na colheita 8 foi isolada apenas 1 cepa de *S. sobrinus*.

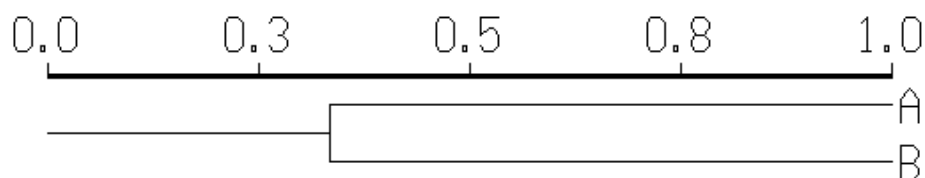
Total de isolados: 55 da criança e 9 da mãe.

Tabela explicativa para genótipos de *S. sobrinus* encontrados no par 4:

| | | | | Genótipos encontrados no par 4 (clone /sítio*) |
|-----------|----------|--|---------------|--|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A/ sítio |
| | 7 | - | 20,2 | - |
| | 8 | 1 | 23,5 | 1 (S) |
| | 9 | - | 25,9 | - |
| | 10 | 7 | 27,6 | 7 (1S,3L,3D) |
| Mãe | | | | 1 (S) |
| Conclusão | | Houve transmissão vertical do clone ^a | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D)

Total de isolados: 8 da criança e 1 da mãe.



Dendrograma 5: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 5.

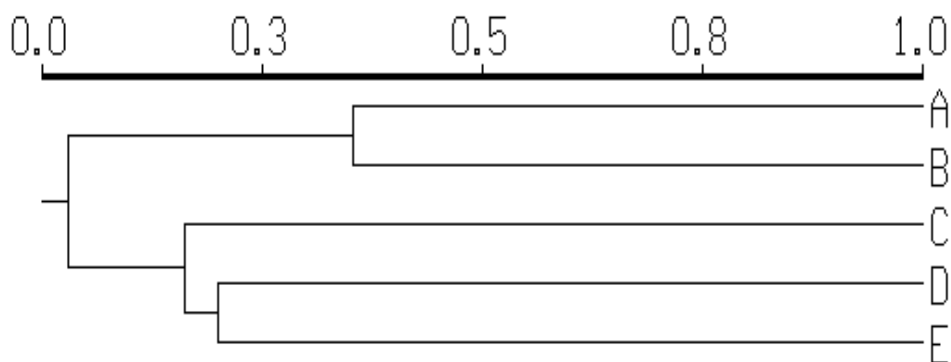
Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrados no par 5:

| | | | | Genótipos encontrados no par 5 (clone /sítio*) | |
|-----------|--|-------------|---------------|--|-------------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) |
| | 5 | 14 | 14,2 | - | 14 isolados (14D) |
| | 6 | 1 | 18,0 | 1 isolado (1D) | - |
| | 7# | - | 22,5 | - | - |
| | 8 | 1 | 24,9 | 1 isolado (1D) | - |
| | 9 | 11 | 26,6 | - | 11 isolados (11D) |
| | 10# | - | 29,0 | - | - |
| Mãe | | | | 10 isolados (S) | 5 isolados (S) |
| Conclusão | Houve transmissão vertical (genótipos B no momento da aquisição inicial e genótipo A, posteriormente), não ocorreu estabilidade. | | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

Não foi isolado nem *S. mutans* nem *S. sobrinus*.

Total de isolados: 27 da criança e 15 da mãe.



Dendrograma 6: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 7.

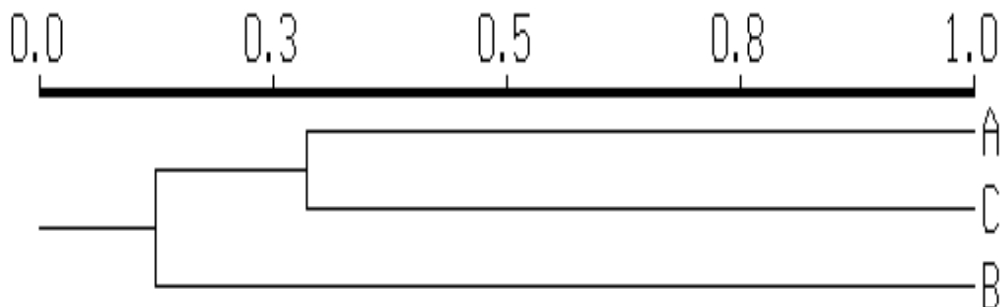
Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrados no par 7:

| | | | | Genótipos encontrados no par 7 (clone /sítio*) | | | | |
|-----------|----------------|--|---------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) | Clone D (sítio) | Clone E (sítio) |
| | 5 | 1 | 17,8 | - | - | 1 isolado (D) | - | - |
| | 6 [#] | - | 21,6 | - | - | - | - | - |
| | 7 | 2 | 26,5 | - | - | - | 2 isolados (L) | - |
| | 8 | 26 | 28,8 | - | - | 2 isolados (2L) | - | 24 isolados (12L, 1G, 11D) |
| | 9 | 21 | 31,6 | 20 isolados (6S, 5L, 9D) | - | - | 1 isolado (S) | |
| Mãe | | | | 6 isolados (S) | 8 isolados (S) | - | - | - |
| Conclusão | | Houve transmissão vertical (posteriormente), porém não ocorreu estabilidade. | | | | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[#] Na colheita 6 isolamos somente *S. sobrinus*.

Total de isolados: 50 da criança e 14 da mãe.



Dendograma 7: representativo dos diferentes genótipos de *S. sobrinus* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 7.

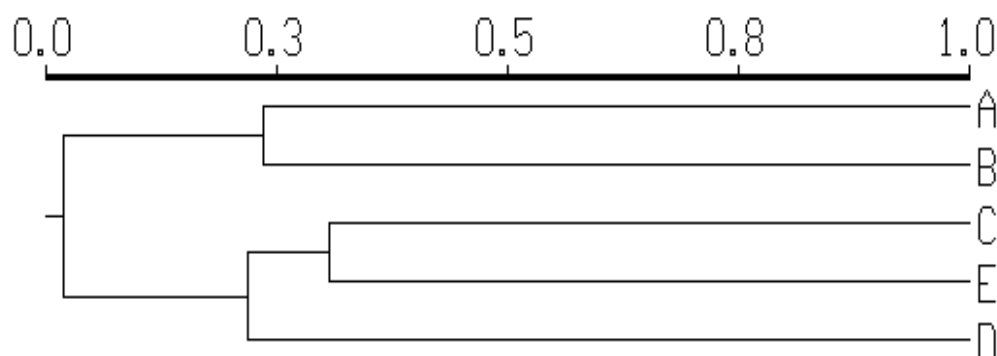
Tabela explicativa para genótipos de *S. sobrinus* encontrados no par 7:

| | | | | Genótipos encontrados no par 7 (clone /sítio*) | | |
|-----------|----------|---|---------------|--|---------------------|-----------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) |
| | 5 | - | 17,8 | - | - | - |
| | 6 | 2 | 21,6 | 2 isolados (L) | - | - |
| | 7 | 9 | 26,5 | 1 isolado (G) | 6 isolados (1G, 5D) | 2 isolados (2D) |
| | 8 | - | 28,8 | - | - | - |
| | 9 | - | 31,6 | - | - | - |
| Mãe | | | | 1 isolado (S) | - | - |
| Conclusão | | Houve transmissão vertical e estabilidade transitória (4,9 meses consecutivos). | | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

Na colheita 6 isolamos somente *S. sobrinus*.

Total de isolados: 11 da criança e 7 da mãe.



Dendrograma 8: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 8.

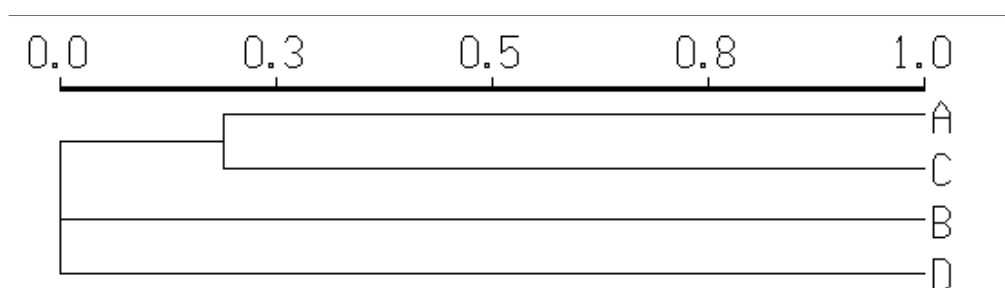
Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrados no par 8:

| | | | | Genótipos encontrados no par 8 (clone /sítio*) | | | | |
|-----------|----------|---|---------------|--|------------------------------|-----------------|---------------------|-------------------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) | Clone D (sítio) | Clone E (sítio) |
| | 4 | 6 | 12,8 | 1 isolado (L) | 5 isolados (2S, 1L, 1G, 1D) | - | - | - |
| | 5 | 16 | 14,9 | 16 isolados (6S, 6L, 3G, 1D) | - | - | - | - |
| | 6 | 15 | 17,9 | 11 isolados (2S, 3L, 6G) | 4 isolados (4L) | - | - | - |
| | 7 | 20 | 19,6 | - | 20 isolados (8S, 6L, 6G) | - | - | - |
| | 8 | 19 | 22,4 | - | 19 isolados (2S, 4L, 9G, 4D) | - | - | - |
| | 9 | 27 | 24,8 | 18 isolados (6S, 5L, 7G) | 1 isolado (1D) | - | 8 isolados (1G, 7D) | - |
| | 10 | 15 | 26,6 | - | 9 isolados (4S, 2L, 1G, 2D) | - | - | 6 isolados (1L, 2G, 3D) |
| Mãe | | | | 9 isolados (S) | 3 isolados (S) | 4 isolados (S) | - | - |
| Conclusão | | Houve transmissão vertical de 2 clones e estabilidade transitória de 1 clone transmitido (3 colheitas consecutivas – 5,1 meses) e estabilidade efetiva do outro clone transmitido (5 colheitas consecutivas – 8,7meses). | | | | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

Total de isolados: 118 da criança e 16 da mãe.

S. sobrinus foi isolado apenas na criança, na colheita 4: 5 isolados todos iguais (genótipo A/ 1S, 3L, 1G).



Dendrograma 9: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 10.

Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrados no par 10:

| | | | | Genótipos encontrados no par 10 (clone /sítio*) | | | |
|-----------|--|-------------|---------------|---|-----------------|-----------------|------------------|
| | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) | Clone D (sítio) |
| Criança | 4 | 2 | 11,6 | - | - | 2 isolados (2S) | - |
| | 5 [#] | - | 15,1 | - | - | - | - |
| | 6 [@] | - | 19,03 | - | - | - | - |
| | 7 | 4 | 21,67 | 2 isolados (S,D) | - | - | 2 isolados (S,D) |
| | 8 | 3 | 23,43 | 3 isolados (D) | - | - | - |
| | 9 [@] | - | 24,47 | - | - | - | - |
| Mãe | | | | 11 isolados (S) | 4 isolados (S) | - | - |
| Conclusão | Houve transmissão vertical (não no momento de aquisição inicial, mas apenas quando da colonização efetiva) e estabilidade (2 colheitas consecutivas – 1,76). | | | | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[#] Na colheita 5 isolamos somente *S. sobrinus*.

[@] Nas colheitas 6 e 9 não foi isolado nenhuma cepa de *S. mutans* nem de *S. sobrinus*.

Total de isolados: 9 da criança e 15 da mãe.

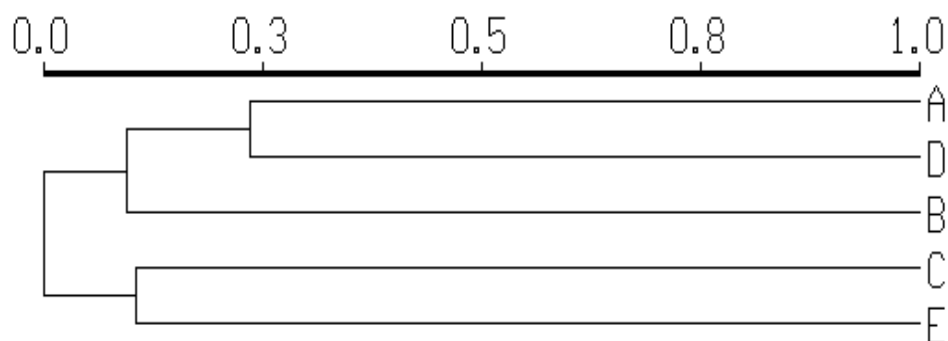
Tabela explicativa para genótipos de *S. sobrinus* encontrados no par 10:

| | | | | Genótipos encontrados na criança 10 |
|---------|----------------|-------------|---------------|-------------------------------------|
| | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio)* |
| Criança | 4 | - | 11,6 | - |
| | 5 [#] | 2 | 15,1 | 2 isolados (S) |
| | 6 [@] | - | 19,03 | - |
| | 7 | 1 | 21,67 | 1 isolado (D) |
| | 8 | - | 23,43 | - |
| | 9 [@] | - | 24,47 | - |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[@] Nas colheitas 6 e 9 não foi isolado nenhuma cepa de *S. mutans* nem de *S. sobrinus*.

Total de isolados: 3 da criança.



Dendrograma 10: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 12.

Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrados no par 12:

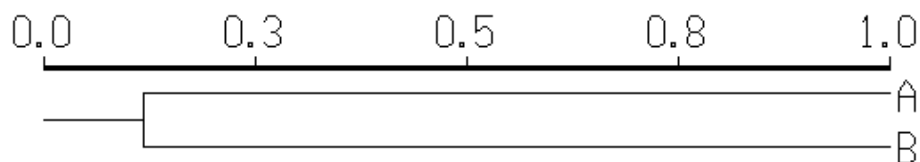
| | | | | Genótipos encontrados no par 12 (clone /sítio*) | | | | |
|-----------|----------------|--|---------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) | Clone D (sítio) | Clone E (sítio) |
| | 5 | 18 | 16,6 | 18 isolados (7S, 4L, 7G) | - | - | - | - |
| | 6 [#] | - | 19,9 | - | - | - | - | - |
| | 7 | 16 | 21,97 | - | - | - | - | 16 isolados (6L, 10D) |
| Mãe | | | | 3 isolados (S) | 3 isolados (S) | 7 isolado (S) | 1 isolado (S) | - |
| Conclusão | | Houve transmissão vertical do clone A, porém não ocorreu estabilidade. | | | | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[#] Na colheita 6 não isolamos *S. mutans* nem *S. sobrinus*.

Total de isolados: 34 da criança e 14 da mãe.

S. sobrinus foi isolado apenas na criança, na colheita 5: 2 isolados todos iguais (genótipo A/2G).



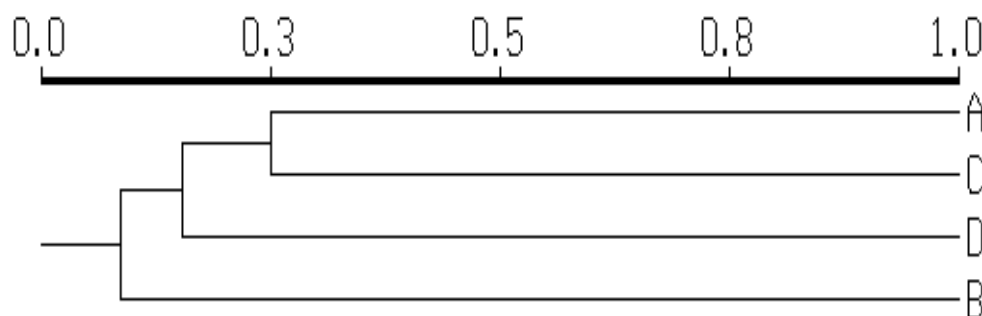
Dendograma 11: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 13.

Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrados no par 13:

| | | | | Genótipos encontrados no par 13 (clone /sítio*) | |
|-----------|---|-------------|---------------|---|-----------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) |
| | 4 | 9 | 14,5 | 9 isolados (1S, 8L) | - |
| | 5 | 20 | 16,1 | 20 isolados (6S, 2L, 4G, 8D) | - |
| | 6 | 23 | 19,0 | 23 isolados (5S, 6L, 6G, 6D) | - |
| | 7 | 29 | 21,3 | 29 isolados (7S, 9L, 7G, 6D) | - |
| | 8 | 14 | 23,2 | 14 isolados (1S, 5L, 4G, 4D) | - |
| | 9 | 16 | 26,0 | 16 isolados (6S, 6L, 3G, 1D) | - |
| Mãe | | | | 1 isolado (S) | 5 isolados (S) |
| Conclusão | Houve transmissão vertical e estabilidade do clone A (6 colheitas consecutivas – 11,5 meses). | | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

Total de isolados: 111 da criança e 6 da mãe.



Dendrograma 12: representativo dos diferentes genótipos de *S. sobrinus* detectados na criança e na mãe do par mãe-filho 17.

Tabela explicativa para genótipos de *S. sobrinus* encontrados no par 17:

| | | | | Genótipos encontrados no par 17 (clone /sítio*) | | | |
|-----------|----------------|-------------|---------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) | Clone D (sítio) |
| | 5 | 1 | 16,6 | 1 isolado (L) | - | - | - |
| | 6 [#] | 0 | 18,7 | - | - | - | - |
| | 7 [@] | 0 | 21,2 | - | - | - | - |
| Mãe | | | | 1 isolado (S) | 1 isolado (S) | 1 isolado (S) | 14 isolados (S) |
| Conclusão | | | | Houve transmissão vertical. | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[#] Na colheita 6 não foi isolado *S. mutans* nem *S. sobrinus*.

[@] Na colheita 7 foi isolado somente *S. mutans* (2 cepas)

Total de isolados: 1 da criança e 17 da mãe.

Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrados no par 17:

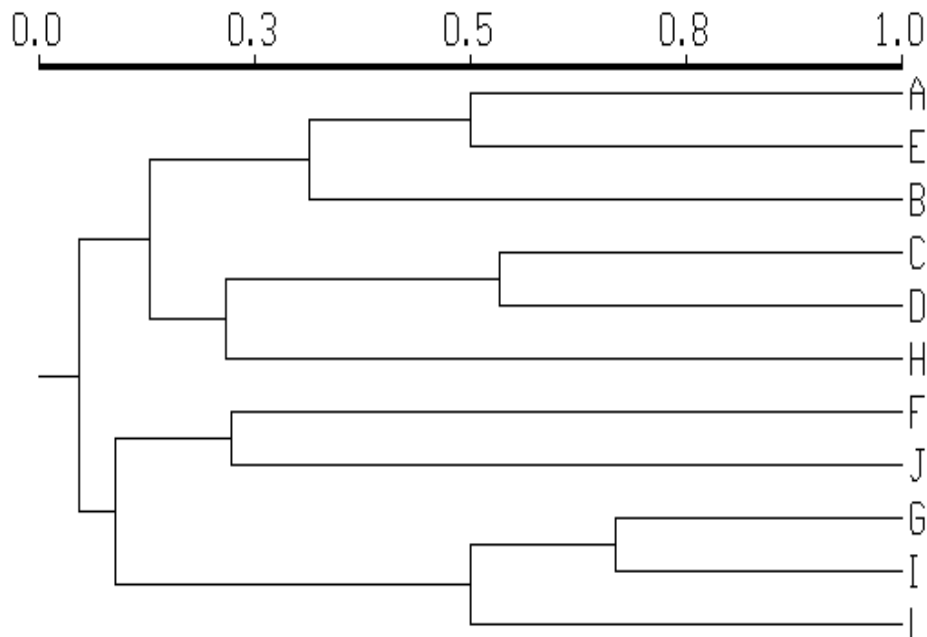
| | | | | Genótipos encontrados no par 17 (clone /sítio*) |
|-----------|----------------|-------------|---------------|---|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) |
| | 5 | 0 | 16,6 | - |
| | 6 [#] | 0 | 18,7 | - |
| | 7 [@] | 2 | 21,2 | 2 isolados (S/D) |
| Mãe | | | | 2 isolado (S) |
| Conclusão | | | | Houve transmissão vertical. |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[#] Na colheita 6 não foi isolado *S. mutans* nem *S. sobrinus*.

[@] Na colheita 7 foi isolado somente *S. mutans*.

Total de isolados: 2 da criança e 2 da mãe.



Dendrograma 13: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 18.

Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrados no par 18:

| | | | | Genótipos encontrados no par 18 (clone /sítio*) | | | | | | | | | | |
|-----------|----------------|--|---------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) | Clone D (sítio) | Clone E (sítio) | Clone F (sítio) | Clone G (sítio) | Clone H (sítio) | Clone I (sítio) | Clone J (sítio) | Clone L (sítio) |
| Criança | 4 [@] | 9 | 14,6 | - | - | - | - | - | 5 isolados (3L, 2G) | 2 isolados (1L, 1G) | 1 isolado (1L) | - | 1 isolado (1G) | - |
| | 5 [#] | 0 | 17,9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 6 | 4 | 20,0 | - | - | - | - | - | - | - | - | 3 isolados (3S) | - | 1 isolado (1G) |
| | 7 [#] | | 22,1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 8 [#] | | 24,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mãe | | | | 2 isolados (S) | 4 isolados (S) | 3 isolados (S) | 2 isolados (S) | 2 isolados (S) | - | - | - | - | - | - |
| Conclusão | | Não houve transmissão vertical e nem estabilidade. | | | | | | | | | | | | |

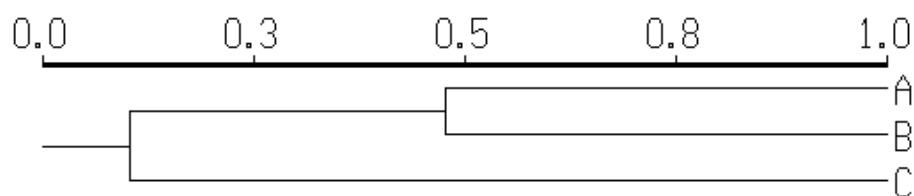
*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[#] Na colheita 5 não foi isolado *S. mutans* nem *S. sobrinus*.

[@] *S. sobrinus* foi isolado apenas nesta colheita (1 isolado).

Total de isolados: 13 da criança e 13 da mãe.

S. sobrinus foi isolado apenas na criança, na colheita 4: 1 isolado (genótipo A/ 1D).



Dendrograma 14: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 20.

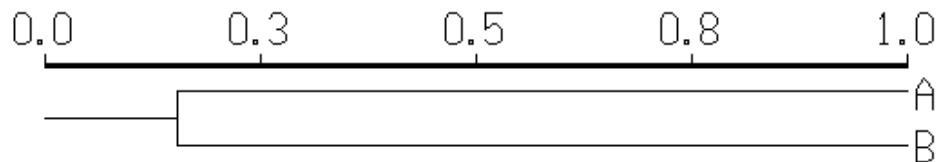
Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrado no par 20:

| | | | | Genótipos encontrados no par 20 (clone /sítio*) | | |
|-----------|----------------|-------------|---------------|---|-----------------|-----------------------|
| | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) |
| Criança | 4 [#] | - | 13,4 | - | - | - |
| | 5 | 12 | 17,7 | 8 isolados (4S,3L,1G) | - | 4 isolados (1L,2G,1D) |
| | 6 [#] | - | 20,0 | - | - | - |
| | 7 | 1 | 22,8 | - | - | 1 isolado (1D) |
| Mãe | | | | 6 isolados (S) | 3 isolados (S) | - |
| Conclusão | | | | Houve transmissão vertical (clone A), porém não ocorreu estabilidade. | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[#] Nas colheitas 4 e 6 isolamos apenas *S. sobrinus*.

Total de isolados: 13 da criança e 9 da mãe.



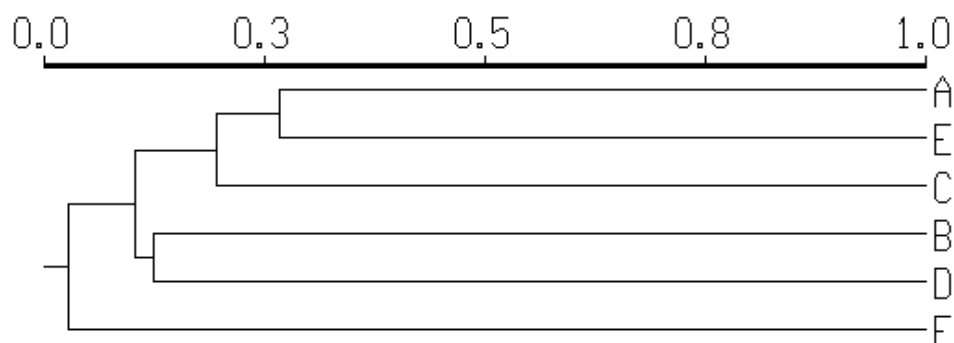
Dendrograma 15: representativo dos diferentes genótipos de *S. sobrinus* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 20.

Tabela explicativa para genótipos de *S. sobrinus* encontrados no par 20;

| | | | | Genótipos encontrados no par 20 (clone /sítio*) | |
|-----------|----------|--|---------------|---|-----------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) |
| | 4 | 1 | 13,4 | - | 1 isolado (S) |
| | 5 | 2 | 17,7 | 2 isolados (2L) | - |
| | 6 | 3 | 20,0 | 3 isolados (3D) | - |
| | 7 | - | 22,8 | - | - |
| Mãe | | | | 2 isolados (S) | - |
| Conclusão | | Houve transmissão vertical (clone A), ocorreu estabilidade transitória (estabilidade de 2 colheitas consecutivas por 2,3 meses – não foi isolado <i>S. sobrinus</i> na última colheita). | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

Total de isolados: 6 da criança e 2 da mãe.



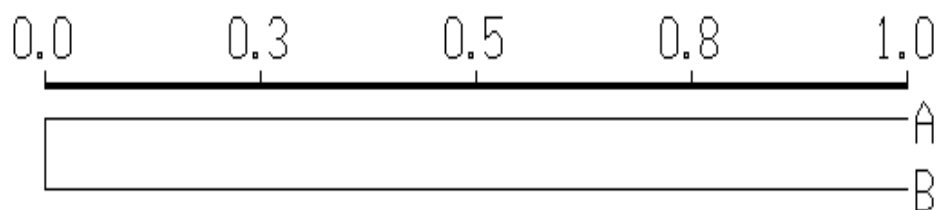
Dendrograma 16: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 23.

Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrados no par 23.

| | | | | Genótipos encontrados no par 23 (clone /sítio*) | | | | | |
|-----------|----------|--|---------------|---|-------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) | Clone D (sítio) | Clone E (sítio) | Clone F (sítio) |
| | 5 | 20 | 16,1 | 12 isolados (12D) | 8 isolados (4S, 2L, 2G) | - | - | - | - |
| | 6 | 26 | 18,5 | - | - | 8 isolados (4S, 1L, 2G, 1D) | 14 isolados (3S, 5L, 4G, 2D) | 4 isolados (4D) | - |
| | 7 | 12 | 20,6 | - | - | - | 9 isolados (9S) | - | 3 isolados (3S) |
| Mãe | | | | 15 isolados (S) | 3 isolados (S) | - | - | - | - |
| Conclusão | | Houve transmissão vertical de 2 genótipos (A e B), ocorreu estabilidade do clone D (não adquirido da mãe), por 2 colheitas consecutivas. | | | | | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).
Total de isolados: 58 da criança e 18 da mãe.

S. sobrinus foi isolado apenas na criança, na colheita 5: 2 isolados iguais (genótipo A/ 2D).



Dendograma 17: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 24.

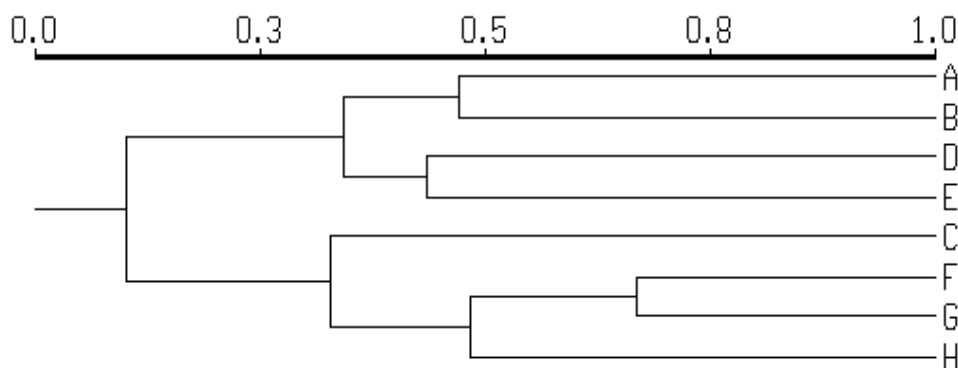
Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrados no par 24:

| | | | | Genótipos encontrados no par 24 (clone /sítio*) | |
|-----------|-----------------------------|-------------|---------------|---|-----------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) |
| | 5 | 3 | 18 | 2 isolados (D) | 1 isolado (D) |
| | 6 [#] | 0 | 20,3 | - | - |
| Mãe | | | | 13 isolados (S) | - |
| Conclusão | Houve transmissão vertical. | | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[#] Na colheita 6 não foi isolado *S. mutans* nem *S. sobrinus*.

Total de isolados: 3 da criança e 13 da mãe.



Dendrograma 18: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e/ou na mãe do par mãe-filho 28.

Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans* encontrados no par 28:

| | | | | Genótipos encontrados no par 28 (clone /sítio*) | | | | | | | |
|-----------|----------------|---|---------------|---|-----------------|-------------------|------------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) | Clone D (sítio) | Clone E (sítio) | Clone F (sítio) | Clone G (sítio) | Clone H (sítio) |
| | 4 [#] | - | 18,4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 5 | 10 | 21,5 | - | - | 10 isolados (10D) | - | - | - | - | - |
| | 6 | 25 | 23,9 | - | - | - | 16 isolados (3S, 4L, 3G, 6D) | 3 isolados (2S, 1G) | 3 isolados (3D) | 1 isolado (D) | 2 isolados (S, D) |
| Mãe | | | | 13 isolados (S) | 1 isolado (S) | - | - | - | - | - | - |
| Conclusão | | Não houve transmissão vertical, nem ocorreu estabilidade. | | | | | | | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[#] Na colheita 4 foi isolado apenas *S. sobrinus*.

Total de isolados: 35 da criança e 14 da mãe.

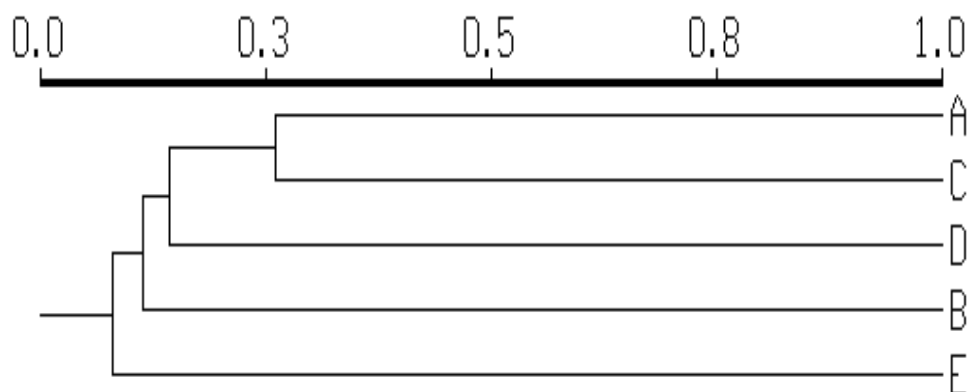
Tabela explicativa para genótipos de *S. sobrinus* encontrados no par 28:

| | | | | Genótipos encontrados no par 28 (clone /sítio*) |
|-----------|----------------|-----------------------------|---------------|---|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) |
| | 4 [#] | 14 | 18,4 | 14 isolados (4S, 5D, 1G, 4L) |
| | 5 | - | 21,5 | - |
| | 6 | - | 23,9 | - |
| Mãe | | | | 2 isolados (S) |
| Conclusão | | Houve transmissão vertical. | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

[#] Na colheita 4 foi isolado apenas *S. sobrinus*.

Total de isolados: 14 da criança e 2 da mãe.



Dendrograma 19: representativo dos diferentes genótipos de *S. mutans* detectados na criança e na mãe do par mãe-filho 32.

Tabela explicativa para genótipos de *S. mutans*:

| | | | | Genótipos encontrados no par 32 (clone /sítio*) | | | | |
|-----------|----------|--|---------------|---|-----------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Criança | Colheita | Nº isolados | Idade (meses) | Clone A (sítio) | Clone B (sítio) | Clone C (sítio) | Clone D (sítio) | Clone E (sítio) |
| | 3 | 6 | 12,6 | - | - | 6 isolados (2S, 1L, 3D) | - | - |
| | 4 | 24 | 14,6 | - | - | - | 24 isolados (8S, 5L, 7G, 4D) | - |
| | 5 | 22 | 18,0 | - | - | 3 isolados (1S, 2D) | - | 19 isolados (5S, 7L, 5G, 2D) |
| | 6 | 13 | 20,3 | - | - | 2 isolados (S, D) | - | 11 isolados (3S, 4L, 2G, 2D) |
| Mãe | | | | 9 isolados (S) | 5 isolados (S) | - | - | - |
| Conclusão | | Não houve transmissão vertical, porém ocorreu estabilidade dos genótipos C e E por duas colheitas consecutivas (2,3 meses) | | | | | | |

*Sítio: saliva (S), dorso de língua (L), rodete gengival (G), placa dental (D).

Total de isolados: 65 da criança e 14 da mãe.

ANEXO 5:

Número de isolados correspondentes a cada um dos 52 genótipos detectados nas crianças.

| Criança | <i>S. mutans</i> | | <i>S. sobrinus</i> | |
|---------|------------------|----------------|--------------------|----------------|
| | Genótipos | Nº de isolados | Genótipos | Nº de isolados |
| 2 | A | 68 | D | 19 |
| | B | 4 | | |
| | C | 2 | | |
| | D | 1 | | |
| 3 | A | 48 | A | 11 |
| | B | 49 | | |
| | C | 1 | | |
| | D | 7 | | |
| 4 | A | 55 | A | 8 |
| 5 | A | 2 | - | - |
| | B | 25 | | |
| 7 | A | 20 | A | 3 |
| | C | 3 | | |
| | D | 3 | | |
| | E | 24 | | |
| 8 | A | 46 | A | 5 |
| | B | 58 | | |
| | D | 8 | | |
| | E | 6 | | |
| 10 | A | 5 | A | 3 |
| | C | 2 | | |
| | D | 2 | | |
| 12 | A | 18 | A | 2 |
| | C | 16 | | |
| 13 | A | 111 | - | - |
| 17 | A | 1 | A | 1 |
| 18 | F | 5 | A | 1 |
| | G | 2 | | |
| | H | 1 | | |
| | I | 3 | | |
| | J | 1 | | |
| | L | 1 | | |
| 20 | A | 8 | A | 5 |
| | C | 5 | | |
| 23 | A | 12 | A | 2 |
| | B | 8 | | |
| | C | 8 | | |
| | D | 23 | | |
| | E | 4 | | |
| | F | 3 | | |
| 24 | A | 2 | - | - |
| | B | 1 | | |
| 28 | C | 10 | A | 14 |
| | D | 16 | | |
| | E | 3 | | |
| | F | 3 | | |
| | G | 1 | | |
| | H | 2 | | |
| 32 | C | 11 | - | - |
| | D | 24 | | |
| | E | 30 | | |
| Total | 52 | 773 | 16 | 84 |

ANEXO 6: Variação de genótipos de *S. mutans* e de *S. sobrinus* durante o acompanhamento.

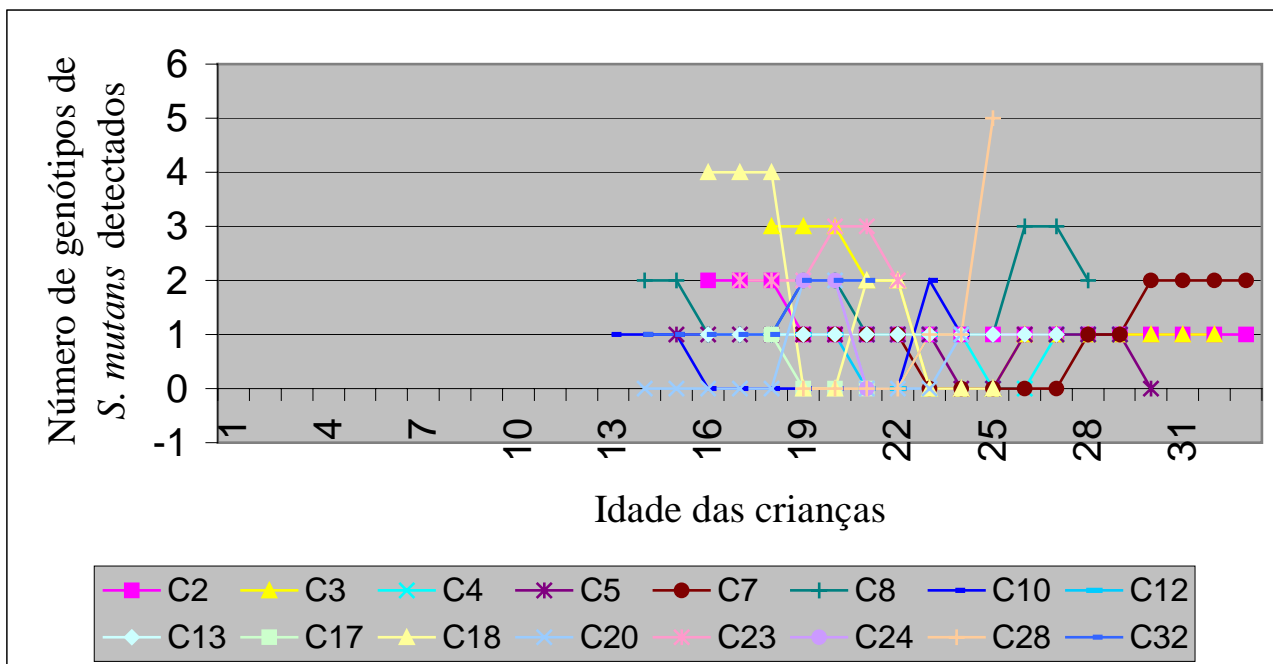


Gráfico do número de genótipos de *S. mutans* detectados nas crianças (C) 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 17, 18, 20, 23, 24, 28 e 32.

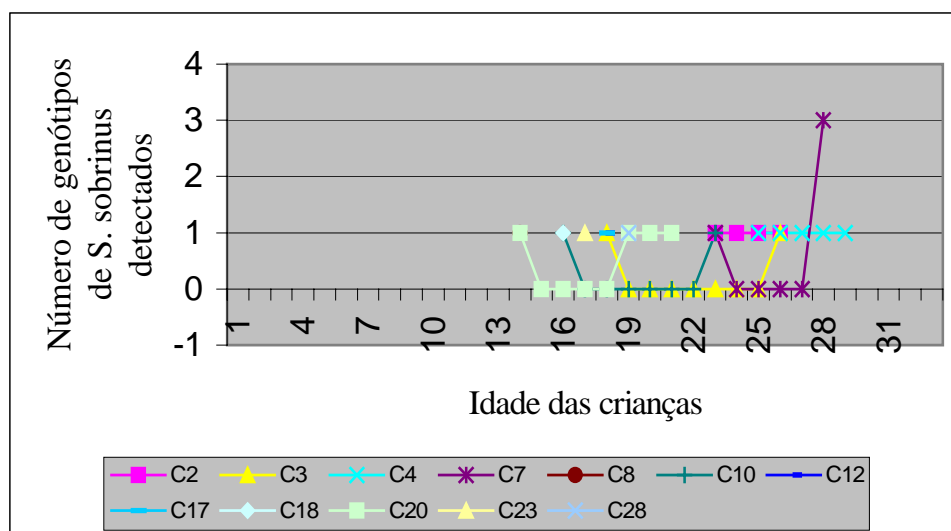


Gráfico do número de genótipos de *S. sobrinus* detectados nas crianças (C) 2, 3, 4, 7, 8, 10, 12, 17, 18, 20, 23 e 28. Nas crianças 5, 13, 24 e 32 não foram detectados genótipos de *S. sobrinus*.